

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE PROGENITORES DE OSTRÁ PORTUGUESA *CRASSOSTREA ANGULATA* (LAMARCK 1819) SUJEITOS A DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS: RELAÇÃO ENTRE A QUALIDADE DOS PROGENITORES, POSTURAS E LARVAS

Nuno Oliveira Duarte

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Aquacultura e
Pescas, na área de Aquacultura

Orientador: Doutor João Varela

Co-Orientadora: Dr^a. Sandra Joaquim

Faro

2012

AGRADECIMENTOS

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese gostaria de expressar os meus agradecimentos particularmente:

Ao Diretor do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) pela possibilidade de ter realizado esta dissertação na Estação Experimental de Tavira;

À Dr. Sandra Joaquim do IPMA, por todo apoio e paciência na orientação, e por toda a disponibilidade demonstrada;

A toda a equipa do IPMA, pela colaboração prestada em vários momentos desta tese e por todo o apoio e convívio.

A minha mulher Carla e restante família pela paciência e apoio.

O Meu muito obrigado.

RESUMO

A caracterização da fisiologia da reprodução, da etologia alimentar e da nutrição da *Crassostrea angulata*, constitui um importante instrumento de trabalho para a melhoria da eficácia de toda a cadeia produtiva desta espécie, com a perspectiva da sua aplicação em maternidades. O presente estudo incide sobre o ciclo reprodutivo, reserva e estratégia de utilização de nutrientes, e respectivos ovócitos assim como a viabilidade larvar de duas populações de *Crassostrea angulata* em diferentes condições ambientais (Rio Sado e Ria de Alvor). De um ponto de vista geral, a actividade gametogénica apresentou um padrão sazonal nos dois locais estudados, o início gametogénico iniciou-se com a subida da temperatura (janeiro), no entanto a população da Ria de Alvor necessitou de mais tempo para atingir a maturação e postura (condicionada pelas temperaturas e disponibilidade de alimento), as fêmeas das duas populações necessitam de mais tempo para amadurecer que os machos, no entanto ficaram sincronizadas no início da postura, demonstrando assim uma estratégia reprodutiva flexível e extremamente dependente dos factores ambientais. Contudo, neste estudo, apesar das diferenças entre os ciclos gametogénicos, a variação dos componentes bioquímicos estudados não apresentou diferenças significativas entre os reprodutores das duas populações. A qualidade dos ovócitos não variou significativamente ao longo da amostragem, no entanto a sua quantidade foi crescente. Efectivamente, o facto da taxa de fecundação ter aumentado neste mês, também não significou um aumento do sucesso da eclosão larvar. Este estudo poderá assim contribuir para a definição de critérios de seleção de reprodutores desta espécie para fins de utilização em maternidades de bivalves como alternativa a outras espécies.

Palavras-chave: *Crassostrea angulata*, ciclo reprodutivo, composição bioquímica, viabilidade larvar

ABSTRACT

Characterization of reproductive physiology, ethology of food and nutrition of *Crassostrea angulata* is an important tool for improving the efficiency of the entire production chain of this species and implementation in hatcheries. This study focuses on the reproductive cycle, storage and strategy use of nutrients, and their oocytes as well as the larval viability of two populations of *Crassostrea angulata* in different environmental conditions (Rio Sado and Ria de Alvor). From a general point of view, the activity gametogenic showed a seasonal pattern in the two study sites, the start gametogenic began with the rise of temperature (January), however the population of the Ria de Alvor needed more time to reach maturity and spawning (conditioned by temperature and food availability), females of both populations need more time to mature than males, however were synchronized at the beginning of spawning, demonstrating a reproductive flexible strategy, highly dependent of the environmental factors. However, in this study, despite the differences between gametogenic cycle, the variation of the biochemical components studied showed no significant differences between the two breeding populations. The quality of the oocytes did not vary significantly throughout the sample, but its quantity was growing. Indeed, the fact of fertilization rate has increased this month, also not meant an increased success of the larvae eclosion. This study may therefore contribute to the definition of criteria for selection of breeding this species for purposes of use in hatcheries as an alternative to other bivalve species.

Keywords: *Crassostrea angulata*, reproductive cycle, biochemical composition, larval viability

ABREVIATURAS E SIMBOLOS

%	Percentagem
µg	Micrograma
µg mg ⁻¹	Micrograma por miligrama
µL	Microlitro
µm	Micrometro
A	Absorvância
ANOVA	Método de Análise de Variância
ARL	Açúcares Redutores Livres
C	Concentração
C ₄ H ₄ O ₆ Na ₂	Tartaro dissódico
CH ₃ OH	Metanol
CHCl ₃	Clorofórmio
CuCl ₂	Sulfato de cobre
d.f.	Graus de liberdade
DGPA	Direção Geral de Pescas e Aquacultura
FL	Fosfolípidos
H	Hipótese do teste estatístico
H ₂ O	Água destilada
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HC	Hidretos de carbono
HCl	Ácido clorídrico
IC	Índice de condição
IG	Índice gonadal
IPMA/INRB	Instituto Português do Mar e Atmosfera
K ₃ Fe(CN) ₆	Ferricianeto de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KCN	Cianeto de potássio
kJ µg ⁻¹	Kilojoule por micrograma
kJ g ⁻¹	Kilojoule por grama
K-W	Teste Kruskal-Wallis
I	Percurso óptico
LD	Limite de deteção
LN	Lípidos neutros

Definição de critérios de seleção de progenitores de ostra portuguesa Crassostrea angulata sujeitos a diferentes condições ambientais.

LT	Lípidos totais
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milimetro
MO	Matéria Orgânica
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ HCO ₂	Formato de amónia
NH ₄ OH	Hidróxido de amónia
nm	Nanómetro
°	Graus Celsius
<i>p</i>	<i>p value</i>
PL	Polissacarídeos
r	Coeficiente de correlação
r.p.m.	Rotações por minuto
s.c.	Sem correlação
T	Temperatura
TCA	Ácido tricloroacético
VE	Valor energético

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS E SIMBOLOS	5
ÍNDICE GERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE	16
1.2. BIOLOGIA DA ESPÉCIE	17
1.2.1. TAXONOMIA	17
1.2.2. ECOLOGIA	18
1.2.3. HABITAT	18
1.2.4. ANATOMIA	19
1.2.5. NUTRIÇÃO	20
1.2.6. REPRODUÇÃO	21
1.3. MÉTODOS DE CULTIVO E PRODUÇÃO EM MATERNIDADE	24
1.3.1. ACONDICIONAMENTO E POSTURA	24
1.3.2. CULTURA LARVAR	25
1.3.3. FIXAÇÃO	25
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. RECOLHA DOS INDIVÍDUOS E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	28
3.2. PARAMETROS AMBIENTAIS	29
3.3. ÍNDICE DE CONDIÇÃO	31
3.4. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS PROGENITORES	31
3.4.1. PROTEÍNAS	32
3.4.2. GLICOGÉNIO	32
3.4.3. LÍPIDOS TOTAIS	33
3.4.4. VALOR ENERGÉTICO	34
3.5. HISTOLOGIA	35

3.6. BIOQUÍMICA DOS OVÓCITOS	37
3.7. ESCARIFICAÇÃO E FECUNDIDADE	43
3.8. FECUNDAÇÃO	43
3.9. ECLOSÃO	43
3.10. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	44
4. RESULTADOS	45
4.1. PARAMETROS AMBIENTAIS	47
4.2. ÍNDICE DE CONDIÇÃO	47
4.3. RÁCIO DE SEXOS	48
4.4. CICLO REPRODUTIVO	49
4.5. ÍNDICE GONADAL	50
4.6. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS ADULTOS	52
4.6.1. PROTEÍNAS	54
4.6.2. LÍPIDOS	54
4.6.3. GLICOGÉNIO	54
4.6.4. CONTEÚDO ENERGÉTICO TOTAL	56
4.7. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS OVÓCITOS	57
4.7.1. PROTEÍNAS	57
4.7.2. HIDRATOS DE CARBONO	58
4.7.3. LÍPIDOS TOTAIS	59
4.7.4. AÇUCARES REDUTORES LIVRES E POLISSACARÍDEOS	60
4.7.5. LÍPIDOS NEUTROS E FOSFOLÍPIDOS	61
4.7.6. MATÉRIA ORGÂNICA TOTAL	63
4.7.7. CONSTITUINTES DA MATÉRIA ORGÂNICA	64
4.7.8. CONTEÚDO ENERGÉTICO TOTAL	65
4.8. FECUNDIDADE DAS FÊMEAS	66
4.9. TAXA DE FECUNDAÇÃO	67
4.10. TAXA DE ECLOSÃO	68
5. DISCUSSÃO	70
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	78
BIBLIOGRAFIA	80
ANEXOS	I

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Produção europeia de ostras entre 1950 a 2010 em toneladas. fonte FAO 2012	17
Figura 2 - Anatomia da <i>C. angulata</i> (adaptado Vilela 1975): A- ânus; AG- abertura urino- genital; B- boca; Br-branquias; P-pericárdio; GD- glândula digestiva; G-gonada; M-manto; MA- músculo adutor.	20
Figura 3 - Ciclo de crescimento de <i>C. angulata</i> : 1- fase adulta; 2- fecundação; 3- início da divisão celular; 4- larva trocófora; 5- Larva velígera (larvaD); 6- larva umbulada; 7- larva em metamorfose 8-juvenil.	23
Figura 4 - Banco natural de ostras do Sado, origem das ostras do estudo (imagem Google Earth 2012).	28
Figura 5 - Mesas ostreícolas utilizadas para o melhoramento de ostras provenientes do banco natural do Sado, na Ria de Alvor.	29
Figura 6 - Tecido selecionado para a preparação histológica.	35
Figura 7 – Esquema de fracionamento das amostras	38
Figura 8 - Observação microscópica da mobilidade do esperma	42
Figura 9 - Observação microscopica de ovócitos (ovócitos com aprox. 50µm)	42
Figura 10 - Fecundação, observação ao microscópio óptico. CP) corpo polar; Esp) espermatozóides.	43
Figura 11 - Variação media mensal da temperatura da água (°) ao longo do período de amostragem noRio Sado e na Ria de Alvor.	45
Figura 12 - Variação mensal da concentração de clorofila <i>a</i> (µg/L) e feopigmentos (µg/L) ao longo do período de amostragem.	46

Figura 13 - Variação média (\pm desvio padrão) mensal do índice de condição de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem, nas populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 47

Figura 14 - Variação média mensal do rácio de sexos ao longo do período de amostragem para as populações da Ria de Alvor e do Rio Sado (M- indivíduos do sexo masculino F- indivíduos do sexo feminino U- indivíduos de indeterminados). 48

Figura 15 - Variação mensal da percentagem de cada estado de maturação da gónada para a população proveniente da Ria de Alvor. (U- estado de repouso; f1- fêmeas em fase de multiplicação das células germinativas; f2- fêmeas em fase de desenvolvimento e maturação dos gâmetas; f3- fêmeas em fase de gâmetas maduros; f4- fêmeas em fase de reabsorção; m1- machos em fase de multiplicação das células germinativas; m2- machos em fase de desenvolvimento e maturação dos gâmetas; m3- machos em fase de gâmetas maduros; m4- machos em fase de reabsorção). 49

Figura 16 - Variação da percentagem de cada estado de maturação da gónada para a população proveniente do Rio Sado. (U- estado de repouso; f1- fêmeas em fase de multiplicação das células germinativas; f2- fêmeas em fase de desenvolvimento e maturação dos gâmetas; f3- fêmeas em fase de gâmetas maduros; f4- fêmeas em fase de reabsorção; m1- machos em fase de multiplicação das células germinativas; m2- machos em fase de desenvolvimento e maturação dos gâmetas; m3- machos em fase de gâmetas maduros; m4- machos em fase de reabsorção). 50

Figura 17 - Variação do índice gonadal total das populações do Rio Sado e da Ria de Alvor, ao longo do período da amostragem, (IG Alvor- índice gonadal da população da Ria de Alvor; IG Sado- índice gonadal da população do Rio Sado). 51

Figura 18 - Variação mensal do índice gonadal da população do Rio Sado e da população da Ria de Alvor por género, ao longo do período da amostragem (IG F- Índice gonadal das fêmeas; IG M- índice gonadal dos machos). 51

Figura 19 - Variação média (\pm desvio padrão) mensal do teor em proteínas ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco) presente nos reprodutores de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 53

Figura 20 - Variação média (\pm desvio padrão) mensal de lípidos totais ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco) presente nos reprodutores de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem nas populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 54

Figura 21 - Variação média (\pm desvio padrão) mensalde glicogénio ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco) presente nos reprodutores de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e de Ria de Alvor. 55

Figura 22 - Variação média (\pm desvio padrão) mensal do conteúdo energético (Kj/mg AFDW) presente nos reprodutores de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 56

Figura 23 - Variação média (\pm desvio padrão) de proteínas ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco) presentes nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem nas populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 58

Figura 24 - Variação média (\pm desvio padrão) do conteúdo em hidratos de carbono ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco) presentes nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem nas populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 58

Figura 25 - Variação média (\pm desvio padrão) mensal dos lípidos totais ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco) presente nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 60

Figura 26 - Variação média (\pm desvio padrão) mensal da percentagem relativa de açúcares redutores livres e polissacarídeos na composição de hidratos de carbono presentes nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 60

Figura 27 - Variação média (\pm desvio padrão) mensal da percentagem relativa de lípidos neutros e fosfolípidos na composição de lípidos totais presentes nos ovócitos

de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 62

Figura 28 - Variação média mensal (\pm desvio padrão) da matéria orgânica total (μg) presente nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 63

Figura 29 - Variação média (\pm desvio padrão) da percentagem relativa em termos de matéria orgânica de proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais presentes nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 64

Figura 30 - Variação média (\pm desvio padrão) do conteúdo energético total ($\text{Kj}/\mu\text{g}$) presente nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 66

Figura 31 - Variação média do número de ovócitos por fêmea durante o período de amostragem, das populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 67

Figura 32 - Variação média (\pm desvio padrão) da taxa de fecundação de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 68

Figura 33 - Variação da taxa de eclosão de larvas normais (larva D) de *C. angulata*, durante o período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 69

Figura 34 - Variação da taxa de eclosão de larvas (Larva D) anormais de *C. angulata*, durante o período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor. 69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos estados de maturação das gónadas (adaptado de Mann 1979). 36

Tabela 2 - Variação mensal das concentrações de sólidos suspensos totais (SST -mg/L) e Matéria Orgânica (M.O.-%) da água ao longo do período de amostragem. 46

1. INTRODUÇÃO

A aquacultura ocupa cada vez mais uma parte importante no suprimento das necessidades alimentares da população mundial devido ao estado de sobre-exploração dos recursos pesqueiros. A aquacultura é uma atividade muito diversificada, que abrange uma vasta gama de espécies, sistemas e práticas. A expansão económica do sector nos últimos 20 anos contribuiu para uma utilização mais eficiente dos recursos para além de poder ser um setor de alavancamento da economia e de criação de emprego. Esta expansão reflecte-se também num aumento da contribuição da aquacultura para o comércio regional e mundial.

A aquacultura como sistema biológico de produção tem uma longa história, no entanto os programas de reprodução eficientes que representem valores económicos importantes são raros e só recentemente se iniciaram, isto significa que grande parte das espécies da aquacultura mundial tem como base ações pouco melhoradas geneticamente (T. Gjedrem, 2004). Se compararmos com os animais terrestres a situação é muito diferente, praticamente não existe animais terrestres domesticados que não tenham sido submetidos a melhorias genéticas. Esta diferença pode estar relacionada com o desconhecimento dos elementos básicos da biologia reprodutiva das espécies de aquacultura que são necessárias para um programa efetivo de seleção.

Se o propósito da seleção é melhorar as características produtivas, o primeiro passo é conhecer e comparar as populações e garantir que as características desejadas sejam transmitidas. A seleção é então praticada pela escolha dos animais que têm valores mais elevados das características desejadas, e que melhor se adaptem ao manejo em aquacultura (Gjedren & Thodesen, 2005).

A produção artificial de juvenis de bivalves com maior significado económico surge, assim, como uma forma de satisfazer as necessidades do setor, uma vez que, permite a obtenção de um produto controlado, fruto de uma seleção de determinadas características, tais como a sobrevivência, o crescimento e a resistência a enfermidades.

O estudo da fisiologia da reprodução, da etologia alimentar e da nutrição constitui um importante instrumento de trabalho para a melhoria da eficácia de toda a cadeia

produtiva em geral. Vetores como, a rusticidade, a precocidade e a eficácia produtiva, são essenciais a uma correta adaptação às modernas condições de cultura. Estas são cada vez mais exigentes sendo indutoras de fatores de stress. O incremento do potencial produtivo do setor da moluscicultura passará assim, pelo aperfeiçoamento das tecnologias de reprodução artificial.

O presente trabalho pretende, de uma forma geral estudar o ciclo gametogénico da ostra portuguesa. Sabendo que as reservas metabólicas, são acumuladas antes da gametogénese, na forma de substratos lípidicos de glicogénio e proteínas e que são utilizados na produção de gâmetas, quando a exigência metabólica é elevada (Mathieu & Lubet, 1993, Massapina *et al.*, 1999, Joaquim *et al.*, 2011). E que o ciclo reprodutivo é influenciado pelas condicionantes ambientais (disponibilidade e qualidade do alimento, temperatura), (Chávez-Villalba *et al.*, 2003). Em geral, as reservas são acumuladas antes da gametogénese, na forma de substratos lipídicos, glicogénio e proteínas e são utilizados na produção de gâmetas quando a exigência metabólica é elevada (Mathieu e Lubet, 1993).

Trabalhos anteriores têm estudado a reprodução de bivalves e a sua composição bioquímica (Massapina *et al.*, 1999, Joaquim *et al.*, 2011). Portanto o estudo e a compreensão do ciclo reprodutivo em diferentes condições ambientais é essencial, os resultados fornecidos por este estudo, poderão melhorar as técnicas e otimizar o acondicionamento de reprodutores desta espécie.

O presente trabalho integra-se no projeto MARINAQUA (Desenvolvimento Tecnológico da Produção em Aquicultura de Invertebrados Marinhos), que tem como objetivo desenvolver de uma forma sustentada a produção de invertebrados marinhos, nomeadamente moluscos bivalves, reforçando os objectivos preconizados pela Política Comum de Pesca, através do desenvolvimento e inovação das tecnológicas de produção, por forma a ultrapassar os problemas que persistem neste setor aquícola (IPMA 2012).

1.1. IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE

A produção de ostras ocorre um pouco por todo o mundo e a variedade de espécies e sistemas de cultivo podem ser variados, segundo William Brook's, que escreveu o livro com o título "The Oysters" em 1891, esta cultura foi desenvolvida no período Romano e consistia na simples coleta e crescimento em postes de madeira e pedras colocadas em zonas de produção natural. Mas é apenas no século XX que foram desenvolvidas técnicas de reprodução e maternidade, o que transformou esta indústria conduzindo à sua sustentabilidade.

A ostra Portuguesa *Crassostrea angulata*, teve uma grande importância comercial na Europa durante todo o século XX até à década de 70, altura em que praticamente desapareceu devido a elevadas mortalidades, provocadas pela mortalidade massiva vulgarmente denominada doença das brânquias (OVVD, *Iridoviridae*) (Héral and Deslous-Paoli, 1990). Para atenuar essa crise foi introduzida na Europa a *Crassostrea gigas*, de modo a substituir a ostra Portuguesa, que não apresentava uma tão severa mortalidade associada a esse mesmo vírus (Comps, 1988).

Atualmente a produção mundial de ostras é de aproximadamente 4.6 milhões de toneladas (figura 1), a China é o maior produtor com cerca de 85% da produção mundial seguida da Coreia e do Japão (FAO 2010). A produção de ostras na Europa baseia-se sobretudo na *C. gigas*, no entanto surgem novas oportunidades para a ostra Portuguesa e para a ostra plana (*Ostrea edulis*). Na década de 50 a Europa produzia aproximadamente 100 000 ton/ano de *C. angulata*, estando hoje reduzida a pequenos produtores, distribuídos essencialmente no estuário do Sado que segundo Direção Geral das Pescas e Aquicultura (2009), foram produzidas em Portugal 98 toneladas de *C. angulata* e 392 toneladas de *C. gigas* no ano de 2008.

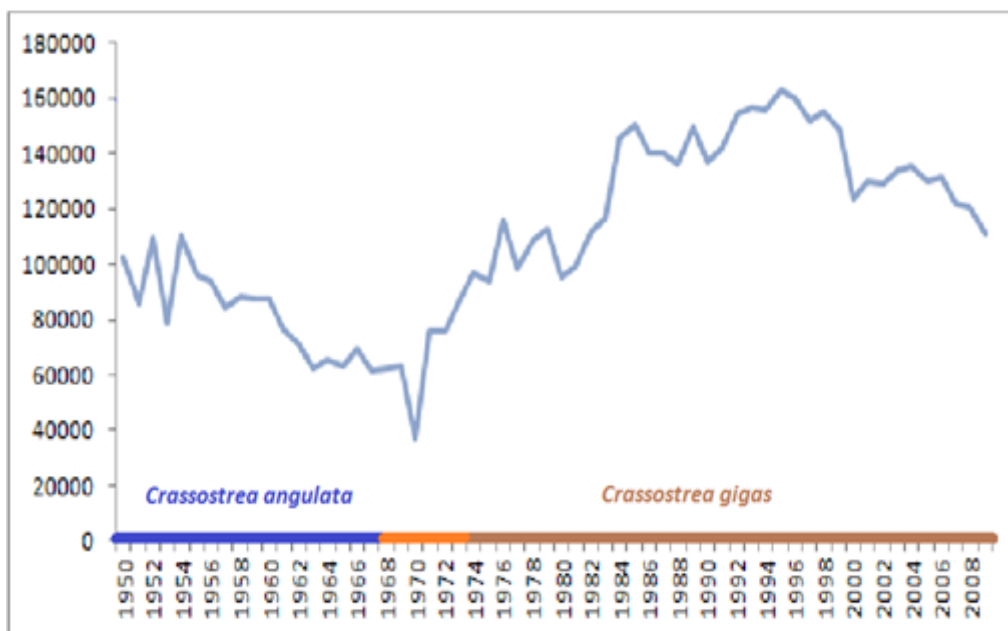


Figura 1: Produção Europeia de ostras entre 1950 a 2010 em toneladas. fonte FAO 2012

Atualmente as populações de *C. angulata* na Europa, estão localizadas em Portugal (Rio Sado e Rio Mira) e no sul de Espanha (FAO 2010). Estas resistiram à mortalidade massiva, bem como à introdução de *C. gigas*, apesar de em muitos locais do sul de Portugal existirem híbridos das duas espécies, o que levanta um enorme problema de variabilidade genética e de manutenção da espécie (Batista, 2007).

1.2. BIOLOGIA DA ESPÉCIE

1.2.1. TAXONOMIA

A espécie em estudo, *Crassostrea angulata* vulgarmente designada em Portugal por Ostra Portuguesa e em Espanha por Ostreon, foi inicialmente designada de *Gryphae angulata* por Lamarck (1819) mais tarde designada por *Ostrea angulata* e por fim incluída no género *Crassostrea* (Sacco, 1897), descrita como *C. angulata*. Atualmente a filogenia de *C. angulata* dentro dos moluscos é a seguinte segundo Worms, 2012:

Filo: Mollusca

Classe: Bivalvia

Sub-Classe: Pterimorphia

Ordem: Ostreoida

Super-Família: Ostreoidea

Família: Ostreidae

Sub-Família: Crassostreinae

Género: *Crassostrea*

Espécie: *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819)

1.2.2. ECOLOGIA

A ostra portuguesa foi inicialmente descrita por Lamarck, como sendo um endemismo da Península Ibérica. Pensava-se que foi introduzida na região francesa de Arcachon em 1867 (Boudry *et al.*, 1998) como uma nova espécie para aquacultura, e que devido ao elevado sucesso, se expandiu por toda a França, e um pouco por toda a Europa. No entanto e só recentemente Boudry *et al.*, (1998), identificou populações de *C. angulata* em Taiwan, de onde se pensa que esta será originária. Estudos usando marcadores mitocondriais reportam a presença de populações “puras” desta espécie em Taiwan, assim é de supor uma origem Asiática que provavelmente é um caso de introdução antropogénica (premeditada ou não) na Europa (Batista, 2007). Hoje em dia esta espécie pode também ser encontrada em Portugal, Espanha e Costa Atlântica de Marrocos (Fabioux *et al.*, 2002).

1.2.3. HABITAT

As ostras ocupam dois tipos de biótopos em função do seu estado de desenvolvimento. Os embriões e as primeiras fases larvares têm um estado plantónico, e os juvenis e adultos são bentónicos. Fixam-se maioritariamente em substratos duros ou lodosos, ao nível das zonas litorais, e podem ser encontradas geralmente em estuários, rias e lagoas, por vezes afastadas vários quilómetros da foz (Ruano, 1997).

Esta espécie apresenta uma grande tolerância às variáveis ambientais, resistindo a grandes amplitudes térmicas e salinidade (Vilela, 1975; Ruano, 1997).

1.2.4. ANATOMIA

São animais de corpo mole lateralmente comprimidos e compostos de duas válvulas articuladas e um potente músculo adutor (Eble & Scro, 1996). O pé está atrofiado e o animal encontra-se no lado esquerdo (válvula à esquerda).

A forma e cor da concha da ostra Portuguesa podem ser um pouco variáveis, devido ao tipo de substrato no qual está inserida. As ostras que crescem em substratos moles têm geralmente, menos lâminas que as que se desenvolvem em substratos duros. O seu interior é branco com uma mancha escura perto da ligação do músculo adutor.

O corpo é coberto por um tegumento designado de manto, que está também envolvido no processo de calcificação da concha, entre os dois lados deste encontra-se a cavidade palial, um espaço livre dividido pelas brânqueas, onde existe a circulação da água através de um processo inalante e exalante (não existe sifão), do qual se obtém o processo de respiração e alimentação. A boca está situado perto do umbro, e o ânus encontra-se próximo do músculo adutor. Durante a fase de reprodução as gónadas ocupam quase toda a totalidade do corpo do animal (Bacca, 2007) (Figura 2).

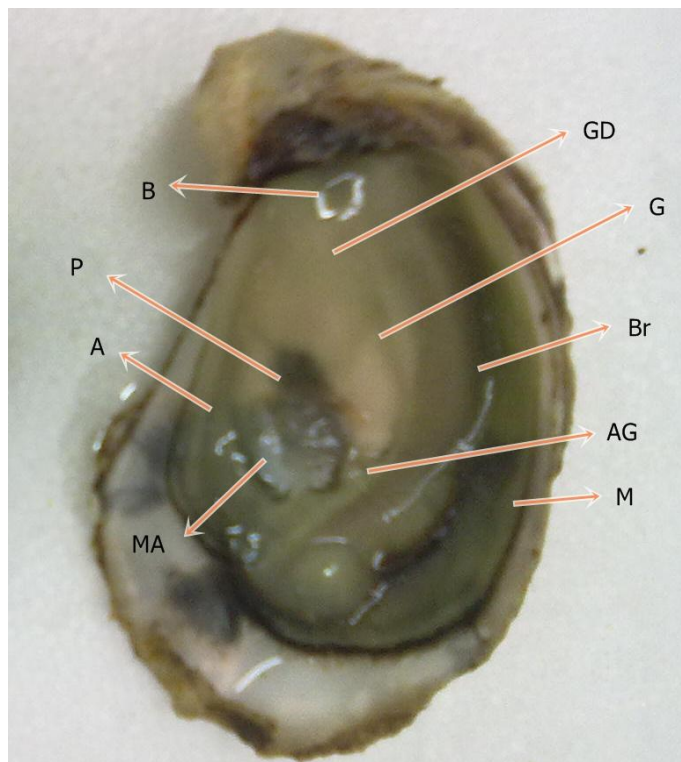


Figura 2: Anatomia da *C. angulata* (adaptado Vilela 1975): A- ânus; AG- abertura urino- genital; B- boca; Br-brânquias; P-pericárdio; GD- glândula digestiva; G-gónada; M-manto; MA- músculo adutor.

1.2.5. NUTRIÇÃO

C. angulata, como outros bivalves, são animais filtradores, assim sendo alimentam-se de fitoplâncton, bactérias, larvas de invertebrados e detritos suspensos na coluna de água (Quayle, 1988).

A alimentação ocorre filtrando grandes quantidades de água, pelas brânquias, eliminando partículas de maiores dimensões (1-10 μm). Segundo Diederich (2006) uma ostra de tamanho médio pode filtrar 30 L/ hora. Este método de alimentação permite absorver os nutrientes e eliminar na forma de pseudofeces as partículas sem interesse para a sua nutrição (Hawkins *et al.*, 1998).

As partículas efetivamente ingeridas, são conduzidas para o estômago coberto de cílios e muco, onde se produz uma trituração mecânica e enzimática (amilase, laminariase, celulase) (Hawkins *et al.*, 1998). É comum a presença de grãos de areia no interior do estômago de modo a facilitar a “trituração” do alimento.

O estômago está ligado á glândula digestiva através canais, que se ramificam em túbulos, nos quais continua a digestão intracelular por fagocitose e por enzimas lisossomáticas. Os resíduos da digestão seguem por um intestino, no qual ainda ocorre a absorção de nutrientes até serem expelidos, através do ânus.

1.2.6. REPRODUÇÃO

A ostra *C. angulata*, é um animal do tipo hermafrodita irregular alternado, que ocorre normalmente como macho na sua primeira maturação sexual, alternando de sexo (supostamente de dois em dois anos). (Vilela, 1975; Lango-Reynoso *et al.*, 1999). No entanto existe uma baixa frequência (entre 0 e 3%) de indivíduos que podem apresentar hermafroditismo simultâneo (Vilela, 1975; Steele and Mulcahy, 1999).

De acordo com Le Dantec (1968), o rácio sexual é geralmente de 1 fêmea para 1 macho (1:1) (Vilela, 1975), porém este fator está intimamente correlacionado com as condicionantes ambientais e o fator demográfico da população (Le Dantec, 1968).

As ostras apresentam um sistema reprodutivo simples, tanto na função como na estrutura, ambos os sexos tem as gónadas constituídas por uma rede de folículos, as quais abrem na câmara exalante através de dois poros genitais localizados sobre as brânquias (Walne, 1974). O aparelho reprodutivo está localizado na região gonadal, entre a glândula digestiva e o manto. Este é constituído por tubos, mais ou menos desenvolvidos, dependendo da fase da gametogénese.

Na maturidade sexual, os tubos gonadais ocupam toda a região da gónada e esta torna-se mais clara. De uma forma geral, a reprodução marca-se por cinco fases: no outono, um estado de repouso marcado pela reorganização do tecido gonadal; no inverno e primavera, a fase de multiplicação das células germinativas por mitoses sucessivas; fase de desenvolvimento e maturação dos gâmetas; na primavera-verão os gâmetas maduros são emitidos por sucessivas posturas na água; por fim ocorre uma fase de absorção dos gâmetas não emitidos após as posturas (Chávez-Villalba *et al.*, 2001). Contudo, o ciclo reprodutivo dos bivalves varia consoante a temperatura da água e o alimento disponível (Joaquim *et al.*, 2008).

A reprodução nesta espécie é externa, os gametas masculinos e femininos são libertados directamente para o meio e a fecundação acontece na coluna de água (Chávez-Villalba *et al.*, 2001). A fêmea pode produzir facilmente 50 a 100 milhões de ovos (com diâmetros entre os 50 a 60 μm) durante uma época (Bacca, 2007).

Após a fertilização, o ovo desenvolve-se gradualmente tendo o seu início em mórula, blástula, gástrula, larva trocófora e larva velígera (larva D)(figura 3). Gradualmente estas vão-se desenvolvendo, transformando-se em larvas pedivelígeras, com o surgimento das brânquias e de um sistema nervoso visível (Bacca H., 2007). Nesta fase as larvas iniciam o processo de fixação ao substrato sofrendo uma metamorfose que leva a uma reorganização completa do animal (Vilela, 1975). A fixação ocorre, geralmente, em conchas de outras ostras, o que pode indicar que são libertadas feromonas por parte dos adultos e/ou dos juvenis (Batista, 2007). Contudo, as larvas podem-se fixar a outros substratos.

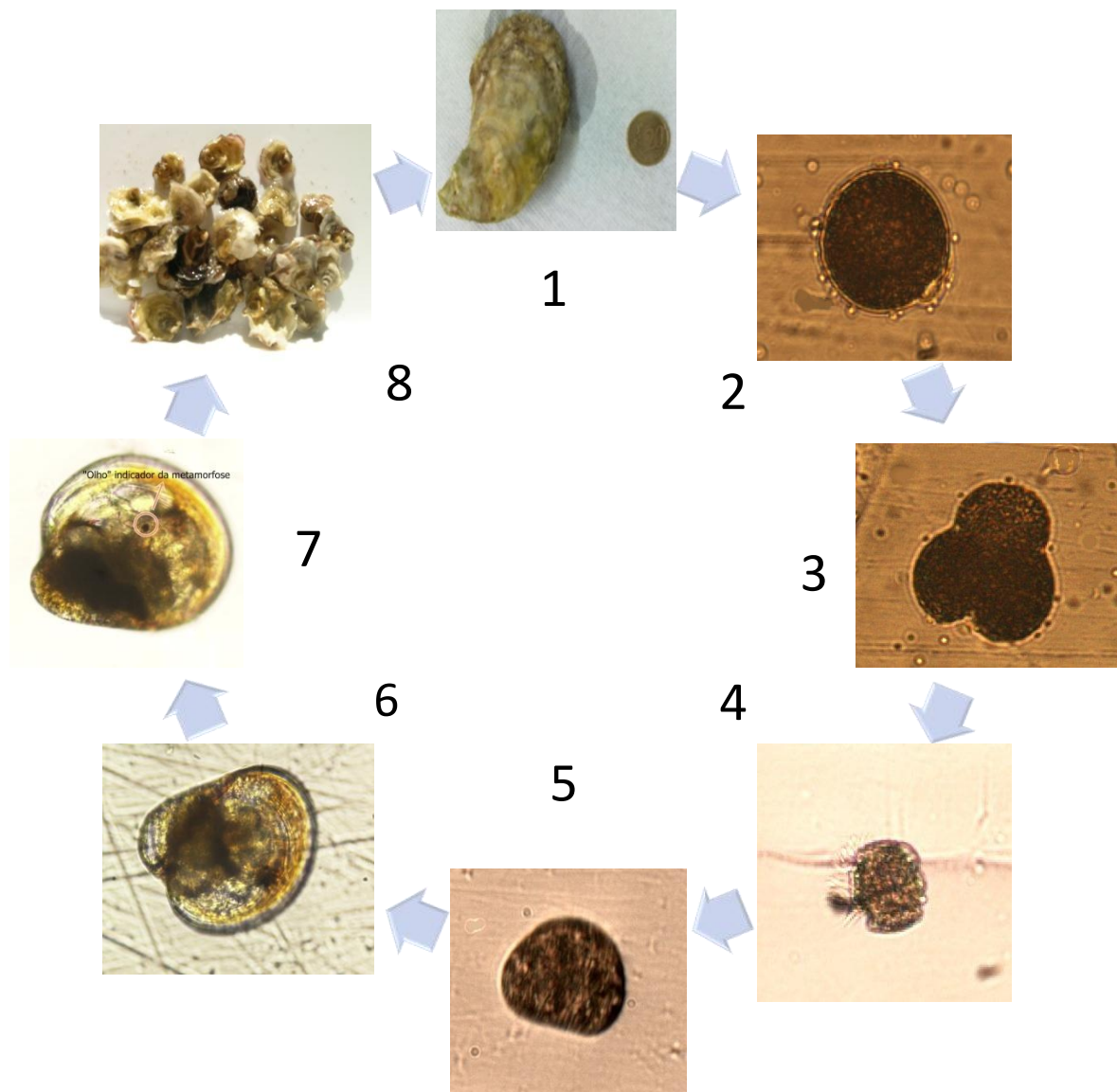


Figura 3: Ciclo de crescimento de *C. angulata*: 1- fase adulta; 2- fecundação; 3- início da divisão celular; 4-larva trocófora; 5-Larva velígera (larvaD); 6-larva umbulada; 7-larva em metamorfose 8-juvenil

O ciclo de vida desta espécie pode demorar de 5 a 24 meses até atingir a sua maturação sexual, dependendo da temperatura do habitat em que está inserida e do nível trófico (Vilela, 1975).

1.3. MÉTODOS DE CULTIVO E PRODUÇÃO EM MATERNIDADE

Na produção ostreícola a obtenção das sementes pode ter duas origens: a captura no meio natural ou a produção em maternidade.

A captura no meio natural está condicionada pelo recrutamento natural da espécie. A disponibilidade de semente depende de fatores ambientais (temperatura, disponibilidade de alimento) e antropogénicos (poluição, sobrepesca), que podem influenciar o recrutamento num determinado ano ou local. Contudo, esta fonte de obtenção de semente pode apresentar vantagens económicas em locais onde a disponibilidade seja grande. As sementes podem ser coletadas através do substrato natural ou por colectores específicos (Batista, 2007).

A produção em maternidade apresenta-se já como uma excelente alternativa à captura do meio natural em *C. gigas*, e poderá ter também interesse para a produção comercial de *C. angulata*.

1.3.1. ACONDICIONAMENTO E POSTURA

Para se obter boas posturas é necessário que os progenitores se encontrem no melhor estado fisiológico, para tal é essencial proporcionar e estimular o desenvolvimento gónadal mesmo fora da época natural de postura. Existem alguns fatores que são primordiais no acondicionamento de adultos para a sua reprodução como p.e. a temperatura, a salinidade e a disponibilidade e qualidade do alimento (Chávez-Villalba *et al.*, 2003; Fabioux *et al.*, 2005). As dietas ideais nesta fase do processo, devem conter na sua composição microalgas ricas em ácidos gordos como a *T. suecica* e a *I. galbana*, uma vez que proporcionam um fornecimento de lípidos para a acumulação de reservas, assim como outras diatomáceas que pelas suas características bioquímicas, tamanho e digestibilidade podem representar uma melhoria substancial no acondicionamento e postura (Joaquim *et al.*, 2008).

A indução da postura em maternidade pode ser efetuada por choque térmico (quente e/ou frio) química (hidróxido de amónia, cloreto de potássio) ou por a adição gâmetas masculinos na água, exposição ao ar, ou injeção de hormonas no músculo

adutor (Galtsoff, 1964). No entanto, um dos métodos mais usados é o da escarificação, que consiste num processo de extração dos gâmetas diretamente da gónada, o que implica o sacrifício dos animais (Joaquim *et al.*, 2008).

1.3.2. CULTURA LARVAR

Após a fertilização, os embriões passam por uma fase larvar plantónica. Segundo Robert e Gérard (1999), existem várias técnicas de cultivo usadas em maternidades comerciais neste período de desenvolvimento larvar, mas as mais comuns são: utilização de um sistema fechado em tanques cilindro-cónicos (até 45m³), onde as larvas são mantidas em baixa densidade (até 10 larvas por ml) com as renovações de água ocorrem a cada 2-5 dias; sistema contínuo onde os volumes são pequenos (até 0.2m³) equipados com filtros que impedem a saída das larvas, as densidade são geralmente muito elevadas e podem ser superiores a 800 larvas por ml (Robert and Gérard, 1999).

A alimentação é adicionada após o aparecimento das primeiras larvas veligeras, esta deve ser rica em lípidos, geralmente, adota-se a utilização de uma quantidade de alimento equivalente ao volume de 100 células de *I. galbana* por µL de cultura de larvas, ou mais corretamente, uma quantidade de alimento de aproximadamente 20% do peso seco das larvas (Joaquim *et al.*, 2008).

Nesta fase, as medidas profiláticas são essenciais para o sucesso da cultura. As boas práticas de higiene em maternidades, redução dos fatores de stress, qualidade da água e o uso de probióticos são fatores preponderantes.

1.3.3. FIXAÇÃO

Durante a fase larvar surge o aparecimento do “olho”, que é indicador da fase pediveligera ou pós larva, ou seja a ostra está pronta para se fixar e ocorrer a metamorfose. Para a fixação, os produtores usam diferentes técnicas, como pequenos fragmentos de casca de ostra onde apenas uma larva se fixe por fragmento (< 400 µm), painéis de fibra de vidro onde as ostras sejam posteriormente facilmente removidas,

ou o uso de técnicas de “cultchless” com uso de químicos que atuam na fase de metamorfose e impedem ou inibem a fixação (Coon *et al.*, 1986).

Após a fixação, as larvas são mantidas em ambiente controlado e protegidas dos predadores durante algum tempo, até atingirem um tamanho suficiente para serem transpostas para o exterior. Nesta fase, as maternidades optam geralmente por uma dieta constituída exclusiva ou parcialmente por fitoplâncton natural .

1.3.4. CULTURA DE JUVENIS

Existem enúmeras técnicas de produção de juvenis, estas são realizadas quase exclusivamente no meio natural, mas dependem muitas vezes dos locais de produção e da capacidade económica do produtor. Pode-se no entanto enumerar algumas, que pela sua utilização se tornaram mais comuns:

- Cultura tradicional: as ostras crescem no fundo de substrato natural ou agregadas a algum material sólido em zonas entre marés;
- Cultura em tabuleiros: cultivadas em sacos (tabuleiro) de malha plástica que são sobrelevados por mesas ostreícolas de madeira ou ferro em zonas entre marés;
- Cultura suspensa em mar aberto: Este método pode variar entre cultura em tabuleiro suspenso, cultura em rede (lanterna chinesa) ou “longline”. As ostras permanecem submergidas em toda a fase de crescimento.

2. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo principal, estabelecer relações de qualidade entre reprodutores ovócitos e larvas de *C. angulata*. Para tal, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Descrição do ciclo gametogénico e avaliação da condição dos progenitores (índice de condição, composição bioquímica e fecundidade) de *C. angulata* estabilada em duas situações ambientais distintas (Rio Sado e Ria de Alvor).
- Definição de índices de qualidade das posturas através da avaliação da composição bioquímica dos ovócitos durante o período natural de postura e da determinação das taxas de fecundação e de eclosão larvar.

A necessidade do estudo desta espécie, torna-se prioritário no contexto da aquacultura nacional, tanto pelo seu valor sócio-económico que esta representa, bem como pela defesa do património genético da ostra portuguesa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. RECOLHA DOS INDIVÍDUOS E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Ostras da espécie *Crassostrea angulata* foram recolhidas mensalmente. Dividiram-se em dois grupos provenientes de um dos poucos bancos naturais desta espécie, que se localiza no Monte da Pedra, Canal de Alcácer no Rio Sado (Figura 4), onde ocupam a zona intertidal de substrato vasoso ou vaso-arenoso, estendendo-se pelo centro do canal até profundidades próximas dos 10m (Ruano, 1994).

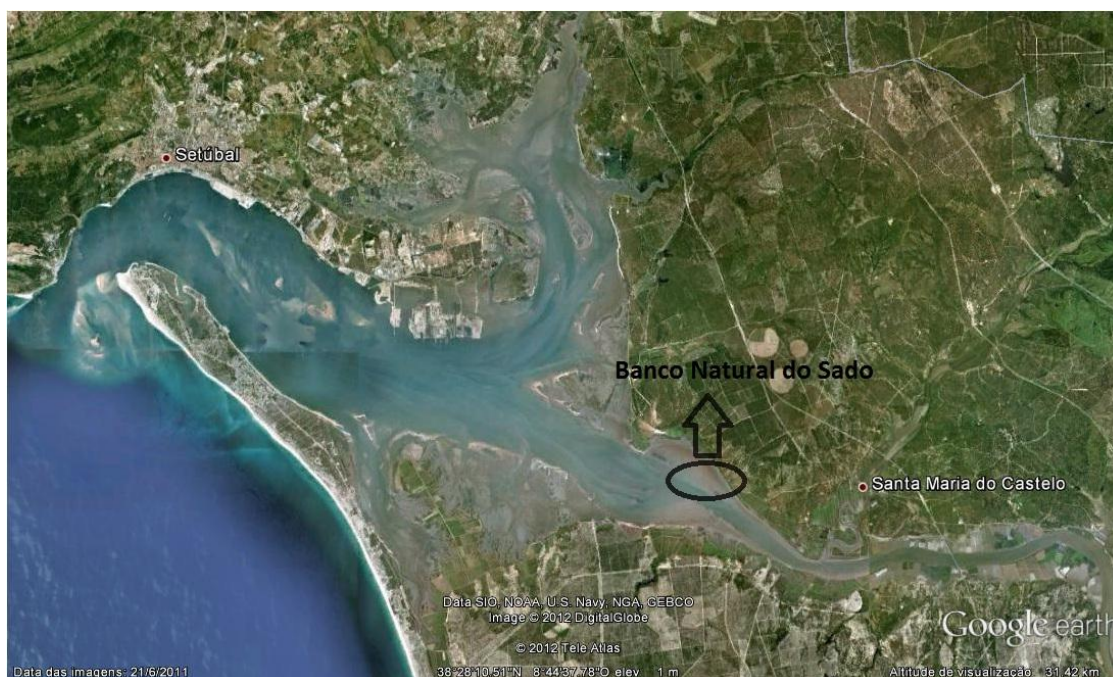


Figura 4: Banco natural de ostras do Sado, origem das ostras do estudo (Google Earth, 2012).

Um dos grupos foi submetido a um melhoramento para fins comerciais e permaneceu aproximadamente 1 ano na Ria de Alvor (Vale da Lama) (Figura 5) em mesas ostrícolas, o outro grupo veio diretamente do Rio Sado.



Figura 5: Mesas ostreícolas utilizadas para o melhoramento de ostras provenientes do banco natural do Sado, na Ria de Alvor.

Os dois grupos foram transportados vivos, devidamente acondicionados em caixas térmicas para a Estação Experimental de Moluscicultura de Tavira onde permaneceram acondicionadas cerca de 48 horas, após as quais se retirou os respetivos indivíduos de cada grupo para a posterior análises laboratoriais, nomeadamente para a análise do índice de condição, composição bioquímica e histologia. Sempre que a maturação sexual dos indivíduos o permitiu, procedeu-se à reprodução artificial.

3.2. PARÂMETROS AMBIENTAIS

Para a determinação da temperatura foi usado uma sonda multiparamétrica OxyGuard.

A determinação da matéria inorgânica, foi feita através de filtração (em filtro de fibra de vidro) da amostra de água recolhida e posteriormente pesada. Para a determinação da matéria orgânica, utilizou-se o método analítico gravimétrico. A quantificação da matéria orgânica foi calculada pela diferença de massas entre a amostra inicial e o resíduo resultante da queima deste em estufa.

Para a determinação da concentração de clorofila *a*, foi utilizado o método espectrofotométrico proposto por Jeffrey & Lorenzen (1980).

Filtrou-se a amostra, e colocou-se este em tubos rolhados. Para a extração adicionou-se 10 ml de acetona a 90% e aguardou-se 24 horas no frio. Agitou-se a amostra e colocou-se a centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, leu-se então as absorvâncias a 750 nm e a 665 nm, adicionou-se 12 µl de HCL a 0.5M e leu-se novamente as absorvâncias a 665 e 750 nm.

As concentrações de clorofila *a* e feofitina *a* foram determinadas com base nas seguintes fórmulas (Lorenzen, 1967):

$$\text{clorofila } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \frac{A \times K [(A_{664} - A_{750}) - (A_{664a} - A_{750a})] \times v}{V \times L}$$

$$\text{feofitina } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \frac{A \times K [R (A_{664a} - A_{750a}) - (A_{664} - A_{750})] \times v}{V \times L}$$

em que:

v = volume de acetona usado para a extracção (ml)

V = volume de água filtrado (l)

L = passo óptico da “cuvette”

A = 11.4

R = valor máximo da razão 664/664_a, na ausência de feopigmentos, (1,8).

K = fator destinado a restabelecer a concentração inicial em clorofila *a* a partir da redução da absorvância, = *R* / (*R*-1), ou seja, 2.25.

3.3. ÍNDICE DE CONDIÇÃO

O índice de condição de Walne & Mann (1975) indica, de uma forma geral a condição fisiológica dos bivalves. Os dados recolhidos, nomeadamente a matéria orgânica e inorgânica, conteúdo em água, conteúdo em cinzas, peso seco da carne e o peso seco da concha dão-nos uma informação primária sobre a qualidade e sobre o estado reprodutivo dos bivalves.

O índice de Condição (Walne & Man, 1975) é expresso segundo a fórmula:

$$IC = \frac{(\text{Peso seco carne (g)} - \text{Peso das cinzas (g)})}{\text{Peso seco da concha}} \times 100$$

A matéria orgânica na parte edível, é calculada pela diferença entre o peso seco da carne e o peso das cinzas.

O índice de condição foi determinado mensalmente em amostras de 10 indivíduos de cada grupo. A carne foi retirada cuidadosamente e colocada sobre papel, de seguida foi pesada numa balança (METTLER) de precisão (0,0000 g) a fim de se obter o peso húmido de cada indivíduo. Para determinar o peso seco da carne e respetiva concha, pesou-se após secagem em estufa a 80° durante 24 horas. O peso das cinzas foi obtido após incineração da parte edível - em mufla a 450° durante 24 horas.

3.4. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS PROGENITORES

Para a determinação da composição bioquímica dos progenitores foram utilizados 10 indivíduos, os quais após determinação do sexo foram mantidos a -20°. Após a descongelação à temperatura ambiente, procedeu-se à homogeneização dos tecidos de cada indivíduo com o auxílio de um Ultra-Torrax. Durante este processo, as amostras premaneceram sobre gelo, para evitar a deterioração dos tecidos. Posteriormente, dividiu-se cada indivíduo em 3 porções para serem utilizadas na determinação das proteínas, do glicogénio, e dos lípidos totais e valor energético.

3.4.1. PROTEÍNAS

A composição em proteínas dos progenitores foi determinada a partir do método modificado de Lowry (Shakir *et al.*, 1994). Para tal, preparou-se as soluções A (carbonato de sódio anidro [Na₂CO₃] e 98,9 mM hidróxido de sódio [NaOH], B1 (0.39mM de sulfato de cobre pentahidratado [CuSO₄5H₂O]), B2 (0.7mM tártaro de sódio/potássio tetreahidratado [KNaC₄H₄O₆4H₂O]) e C (900μL da solução A + 50 μL da solução B1 +50 μL da solução B2).

Após pesagem (METTLER) (0,190-0.210g) adicionou-se 500 μl de solução de sacarose em EDTA e agitou-se 5 minutos em Stomarker, após os quais juntou-se 4,5 ml de NaOH e deixou-se repousar a 4°C por 30 minutos. Filtrou-se então as amostras, retirou-se 200 μl do filtrado e posteriormente adicionou-se 4,8ml de NaOH N/100.

Para a realização da determinação foram utilizados dois replicados de 300 μl aos quais adicionou-se 1 ml da solução C, na qual após incubação em estufa a 37° por 3 minutos se juntou o reagente Folin-Colciteau (diluido 1:1). Incubou-se novamente por 3 minutos a 37°.

Posteriormente, determinou-se a absorvância. As leituras obtidas espectralmente (GENESYS 6) a 750 nm foram convertidas em concentração de proteína através de uma reta de calibração construída com as absorvâncias de uma solução padrão de albumina bovina (*BSA - Bovine serum albumin*) com 5 concentrações diferentes, variando entre 10 e 50 μg/μl e um branco (300 μl de H₂O). Os resultados foram expressos em μg.mg⁻¹ de peso seco.

3.4.2. GLICOGÉNIO

As concentrações de glicogénio foram determinadas segundo o método descrito por Viles & Silverman (1949). Após secagem a 80° em estufa durante 24 horas, triturou-se, homogenizou-se e pesou-se (KERN 770) (2.2 mg a 0.4 mg) as amostras, em dois replicados. Em seguida adicionou-se 500μL de hidróxido de potássio 33% [KOH] que permaneceu a 100° durante 15 minutos durante os quais se agitou duas vezes. Arrefeceu-se e posteriormente adicionou-se 25μL de Na₂SO₄ e 1ml de etanol a 96%. Assim colocou-se em banho de gelo para precipitar (±30 minutos).

Procedeu-se á centrifugação (SIGMA 2-15) durante 10 minutos a 3000 r.p.m., após os quais decantou-se o sobrenadante, e dissolveu-se o precipitado em 250 µL de água destilada e 500 µL de etanol. Precipitou-se, centrifugou-se (SIGMA 2-15) e decantou-se novamente com os mesmos processos descritos anteriormente. Redissolveu-se o precipitado em 200 µL de água destilada.

Para a determinação adicionou-se 1,5 mL de solução de antrona (38 ml de ácido sulfúrico concentrado ao qual adicionou-se 15 ml de água destilada e 0,075 g de antrona) após o qual colocou-se em banho de água a 90°C durante 20 minutos. Posteriormente, foi determinada a absorvância. A curva de calibração obteve-se a partir glicogénio (sigma) standart com 5 concentrações diferentes variando entre 10 e 200 µg/mL e um branco de 200 µl de água destilada. Os resultados foram expressos em µg.mg⁻¹ de peso seco.

3.4.3. LÍPIDOS TOTAIS

Para a extração de lípidos totais utilizou-se o método modificado de Charring (Marsh & Weinstein, 1966). Pesou-se (5 a 6 mg) (KERN 770) dois replicados da amostra a qual juntou-se 1 ml da solução de clorofórmio: metanol (2:1) para solubilização dos lípidos. Este processo ocorreu no escuro a 20° durante 30 minutos Em seguida foi adicionou-se a cada amostra 200µL de uma solução de NaCl a 0,7%, sendo centrifugadas (SIGMA 2-15) a 3000 r.p.m. durante 5 minutos a fim de se obter uma solução difásica. Retirou-se 500 µL da fase solvente que posteriormente se colocou em banho de água a 80° durante 30 minutos a fim de remover o solvente. Após arrefecimento, adicionou-se 1 ml de ácido sulfurico concentrado (H₂SO₄) e levou-se á estufa (MEMMET V 40) a 200° durante 15 min. De seguida adicionou-se 1,5ml de água e após a homogeneização, lêu-se as absorvâncias a 375nm (GENESYS 6). A curva de calibração foi preparada com uma solução de colesterol standart. Os resultados foram expressos em µg.mg⁻¹ de peso seco.

3.4.4. VALOR ENERGÉTICO

Os fatores de conversão em energia para as proteínas, glicogénio e lípidos foram 17,9; 17,2; 33,0 kJ g⁻¹, respectivamente.

3.5. HISTOLOGIA

Para a análise histológica foram selecionados aleatoriamente 15 indivíduos de cada população. Após dissecação da parte edível de cada indivíduo, esta foi fixada num volume de solução de Davison (150 mL H₂O, 90 mL formol, 45 mL etanol e 15 mL ácido acético) durante 48h e, posteriormente armazenou-se em etanol a 70% até subsequente análise. Para a análise histológica seleccionou-se o tecido (conforme Figura 6) correspondente á gónada e procedeu-se á desidratação e impregnação num processador de tecidos, cada indivíduo foi imerso em banhos sucessivos de etanol e butanol, terminando em parafina.

Numa consola de parafina, fez-se a inclusão das amostras nos blocos, a partir dos quais procedeu-se aos cortes histológicos (com espessura de 7µm), num micrótomo, os quais colocou-se em lâminas de vidro. Após este processo, procedeu-se à desparafinação em banhos de butanol e re-hidratação em banhos sucessivos de álcool cuja concentração diminuiu até a utilização água destilada. Finalmente coraram-se as lâminas, emergindo-as em banhos consecutivos de solução de Hematoxilina de Harris (Hematoxilina, etanol 95%, alúmen de ferro e ácido sulfúrico), solução de Eosina (1g/100ml), etanol absoluto e butanol. Após a coloração os cortes foram cobertos com lamelas em meio de montagem com resina sintética (DPX).

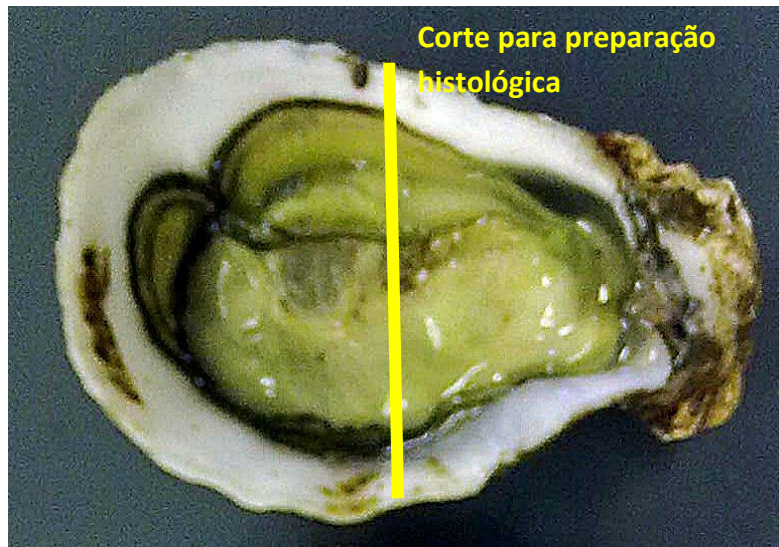


Figura 6: Tecido selecionado para a preparação histológica.

Posteriormente observou-se os cortes através do microscópio, determinou-se o sexo de cada indivíduo e classificou-se o estado de maturação da gónada em 5 estados segundo Mann (1979):

Tabela 1: Classificação dos estados de maturação das gónadas (adaptado de Mann, 1979)

Estado	Descrição
0	<ul style="list-style-type: none"> Não existem evidências da presença de folículos. O tecido conjuntivo ocupa a totalidade;
1	<ul style="list-style-type: none"> Nas fêmeas as ovogônias resultam a partir de células-tronco ao longo do folículo; não existe oócitos livres. O tecido conjuntivo é muito abundante. Nos machos surgem pequenos folículos; espermatogonias e espermátócitos, não existe a presença de espermatozoas;
2	<ul style="list-style-type: none"> Intenso desenvolvimento dos gametas. As células permanecem agregadas às paredes mas entram em crescimento, fase de vitelogênese. Inicia-se a espermatogênese com I e II espermátócitos, espermátides e poucos espermatozoides. Devido ao aumento do tamanho dos gametas o tecido conjuntivo começa a reduzir-se;
3	<ul style="list-style-type: none"> Período de maturidade sexual. Ácinos estão completamente preenchidos com os oócitos maduros (com um tamanho relativamente homogêneo), observa-se um núcleo distinto e, por vezes, o nucléolo é visível. Abundam espermatozoides que formam zonas compactadas, praticamente desaparece o tecido conjuntivo;
4	<ul style="list-style-type: none"> Fase de emissão de gametas maduros e/ou reabsorção. A emissão pode ser completa ou parcial, por vezes observa-se uma nova gametogênese a iniciar-se, ou encontram-se gametas em fase de reabsorção.

O índice gonadal foi determinado com base na tabela descrita em cima calculada pela seguinte fórmula proposta por Seed (1976):

$$IG = \frac{\text{somatório número de indivíduos de cada estado de desenvolvimento} \times \text{classificação atribuída}}{\text{número total de indivíduos em cada amostra mensal}}$$

Atribuindo os seguintes valores aos estados: 0- estado de repouso (0) ; 1- fase de multiplicação das células germinativas (1); 2- fase de desenvolvimento e maturação dos gametas (2); 3- fase de gametas maduros (3); 4- fase de reabsorção (4);

3.6. BIOQUÍMICA DOS OVÓCITOS

Para a determinação dos componentes bioquímicos dos ovócitos, utilizou-se o método de fraccionamento descrito por Holland & Gabbott (1971).

Após a recolha, os ovócitos foram guardados a -20° e posteriormente liofilizados (SAVANT). De cada amostra de ovócitos foram retirados entre 2000 µg e 3000 µg aos quais se adicionou 500 µL de H₂O. Para obter a rutura e desagregação dos tecidos dos ovócitos, processou-se as amostras em ultra-som a frio (VIBRACELL SONICS & MATERIALS) com impulsos de 20 watts de potência. Homogeneizou-se os tecidos, retirou-se duas subamostras de 200 µL para Eppendorf's, as quais sofreram diferentes esquemas de fraccionamento conforme Figura 7.

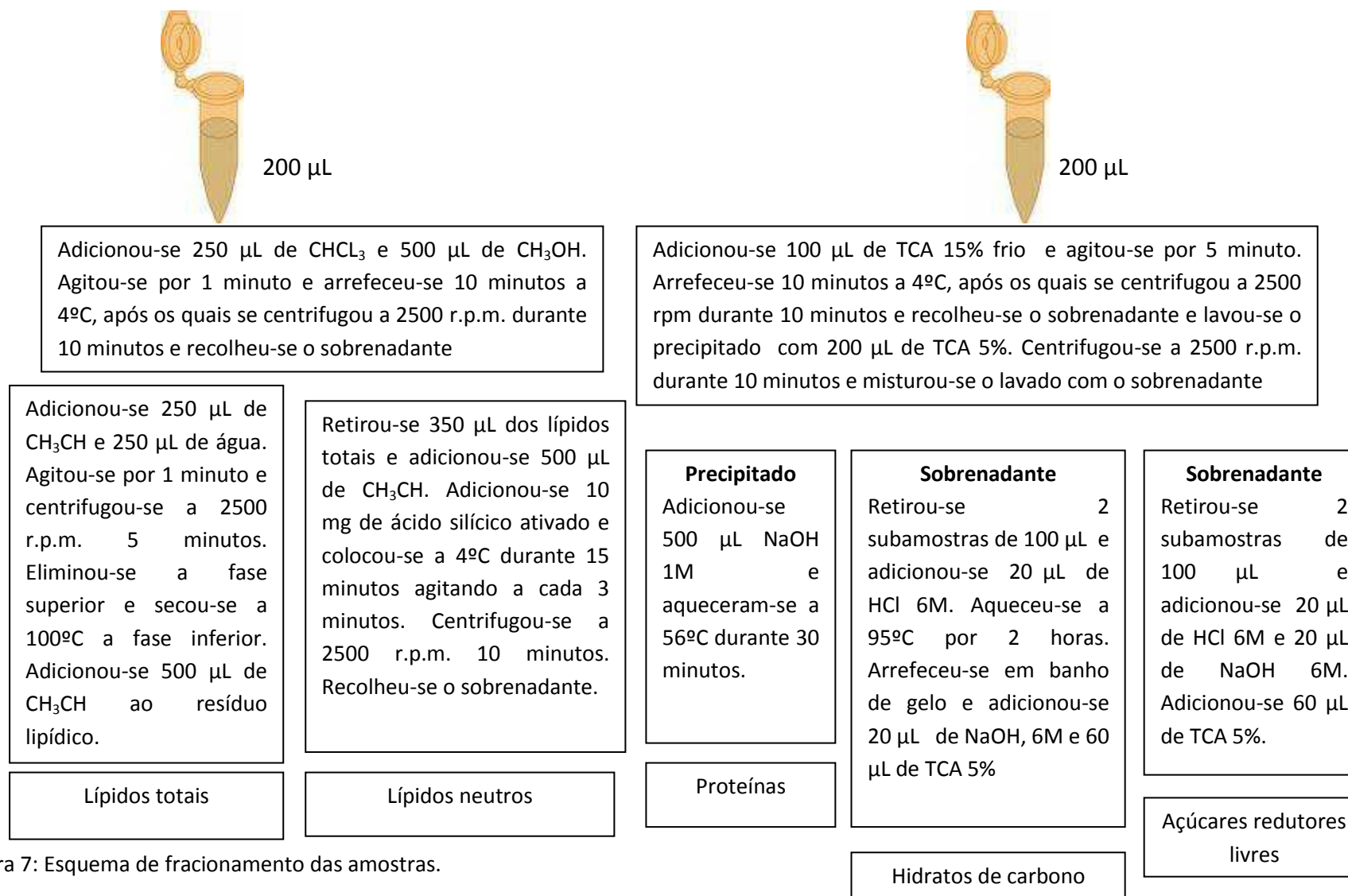


Figura 7: Esquema de fracionamento das amostras.

3.6.1. PROTEÍNAS

Para a determinação das proteínas foi utilizado o método de Lowroy *et al.*, (1951) modificado por Bensadoun & Weinstein (1979) e Hess *et al.*, (1978) usando o padrão de seroalbumina como padrão.

De 2 tomas de 50 µl de proteínas, adicionou-se 450 µl de reagente I e 300 µl de reagente C a cada amostra. Agitou-se e posteriormente adicionou-se 300 µl de reagente C. Após nova agitação, colocou-se as amostras a incubar no escuro durante 45 minutos. Posteriormente, determinou-se a absorvância. A curva de calibração para as proteínas obteve-se a partir do padrão Seroalbumina Bovina com 6 concentrações diferentes, variando entre 5 e 50 µg/µl e um branco (50 µl de H₂O). Utilizou-se concentrações padrão (Figura 1, Anexol)

- Reagente A: 0.2 g de C₄H₄O₆Na₂ + 10 g de Na₂CO₃ + 69 ml de NaOH 0.8 N e perfazer a 100 ml com H₂O.

- Reagente B: 2 g de C₄H₄O₆Na₂ + 1 g de CuSO₄ + 12.5 ml de NaOH 0.8N e perfazer a 100 ml com H₂O.

- Reagente I: 25 ml de NaOH 0.8N + 18 ml do reagente A + 2 ml do reagente B

- Reagente C: Reagente Folin – Colciteau : H₂O (1:2)

3.6.2. HIDRATOS DE CARBONO E AÇÚCARES REDUTORES LIVRES

A determinação foi efectuada de acordo com o método HOLLAND & GABBOTT (1971). Adiciou-se às amostras 500 µl de NaOH 0.625%, 100 µl de K₃Fe(CN)₆ 0.2% e 200 µl de reagente carbonato/cianeto, sendo estas, seguidamente, colocou-se a aquecer a 95° durante 15 minutos. Após o arrefecimento, adicionou-se 500 µl de H₂O. Seguiu-se a determinação da absorvância. (A curva de calibração obteve-se a partir da concentração padrão da glucose com 5 concentrações diferentes, variando entre 1.25

e 15 µg/µl e um branco (200 µl de H₂O). Para cada padrão foram feitas 4 réplicas (Figura 3 Anexol).

- *Reagente carbonato/cianeto*: 500 µl de Na₂CO₃ a 16% + 30 µl KCN 5% e perfazer até 10 ml com H₂O.

3.6.3. POLISACARÍDEOS

Os polissacarídeos foram determinados pela diferença entre os valores dos hidratos de carbono e dos açúcares redutores livres.

3.6.4. LÍPIDOS TOTAIS

Para a determinação dos lípidos totais utilizou-se o método de Marsh & Weinstein (1966). A partir dos lípidos fracionados foram retirou-se 150 µl de cada amostra e colocados a 100° a fim de evaporar o solvente (Cl₃CH). Adicionou-se 500 µl de H₂SO₄ e agitou-se. Colocou-se em estufa a 200° durante 30 minutos, após os quais adicionou-se 1.5 ml de H₂O. Determinou-se então as absorvâncias. A curva de calibração (Figura 2, Anexo I) foi obtida a partir do padrão Tripalmitina com 5 concentrações diferentes, variando entre 5 e 40 µg/µl e um branco (500 µl de Cl₃CH). Para cada concentração de padrão foram feitas 3 réplicas (Figura 2, Anexo I).

3.6.5. LÍPIDOS NEUTROS

Os lípidos neutros foram determinados com o mesmo método descrito anteriormente (Marsh & Weinstein, 1966) alterando-o em dois pontos: retirou-se 200 µl dos lípidos fracionados e colocou-se as amostras em estufa a 100° durante 20 minutos. Não alterando o restante método.

3.6.6. FOSFOLÍPIDOS

O conteúdo de fosfolípidos foi determinado com base na diferença entre o teor bioquímico dos lípidos totais e dos lípidos neutros.

3.6.7. MATÉRIA ORGÂNICA

Para determinar o conteúdo de matéria orgânica somou-se os constituintes de lípidos totais, proteínas e hidratos de carbono.

3.6.8. VALOR ENERGÉTICO

Os fatores de conversão em energia para os lípidos totais, hidratos de carbono e proteínas foram 35.24, 17.16 e 18.00 KJ g⁻¹, respectivamente (Beukema & De Bruin, 1979).

Os resultados relativos às proteínas, lípidos totais, lípidos neutros, fosfolípidos, hidratos de carbono, açúcares redutores livres e polissacarídeos encontram-se expressos em µg/ 100 µg de peso seco. A composição de hidratos de carbono (açúcares redutores livres e polissacarídeos) e de lípidos totais (lípidos neutros e fosfolípidos) foi, também, expressa em percentagem de hidratos de carbono e de lípidos totais, respectivamente.

3.7. ESCARIFICAÇÃO E FECUNDIDADE

Para o processo de escarificação foram verificados microscopicamente, a mobilidade dos espermatozóides (Figura 8) e o aspecto e quantidade dos ovócitos das fêmeas (Figura 9) a fim de serem selecionados 11 indivíduos onde existisse viabilidade reprodutiva (6 fêmeas e 4 machos).

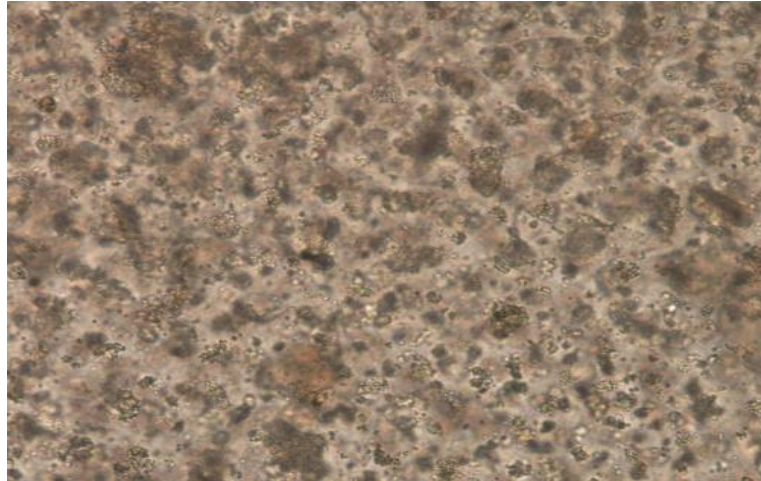


Figura 8: Observação microscópica da mobilidade do esperma

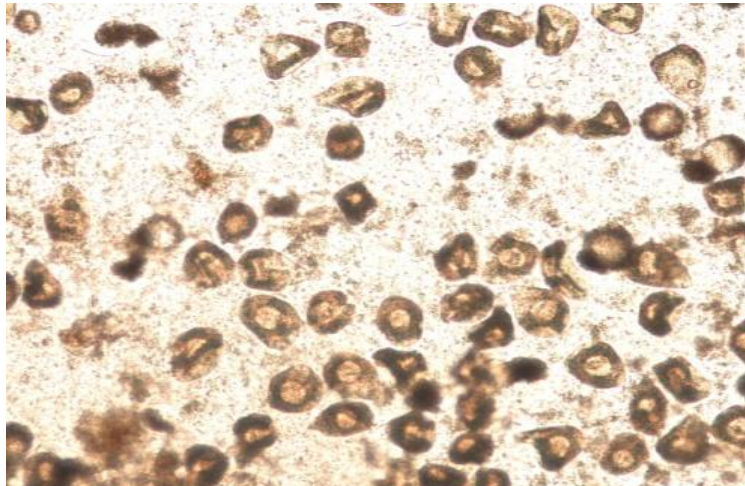


Figura 9: Observação microscópica de ovócitos (ovócitos com aprox. 50 μ m)

No processo de escarificação, separou-se e numerou-se as fêmeas (de 1 a 6). Diluiu-se os ovócitos em 200 mL de água a 30 após passagem por um crivo de 100 μ m para retirar impurezas e tecidos em suspensão, e por um crivo de 20 μ m para reter os ovócitos.

O número de ovócitos foi então estimado a partir de 3 contagens de 100 μ L onde se retirou amostras de cerca de 200 000 ovócitos, em triplicado, para posterior análise bioquímica.

Para a obtenção do esperma, escolheu-se 4 machos com viabilidade e escarificou-se, diluiu-se e filtrou-se o esperma num crivo de 20 μ m para reter possíveis

impurezas e tecidos em 1L de água do mar devidamente filtrada e esterilizada por U.V..

3.8. FECUNDAÇÃO

Após aproximadamente 1 hora efetuou-se a fecundação, adicionou-se uma quantidade de esperma (aproximadamente 10 espermatozóides por ovócito) aos ovócitos de cada fêmea e posteriormente avaliada a taxa de fecundação através de observação e contagem microscópica dos ovócitos fecundados versus os não fecundados, estabeleceu-se como indicador o aparecimento do corpo polar (Figura 10).

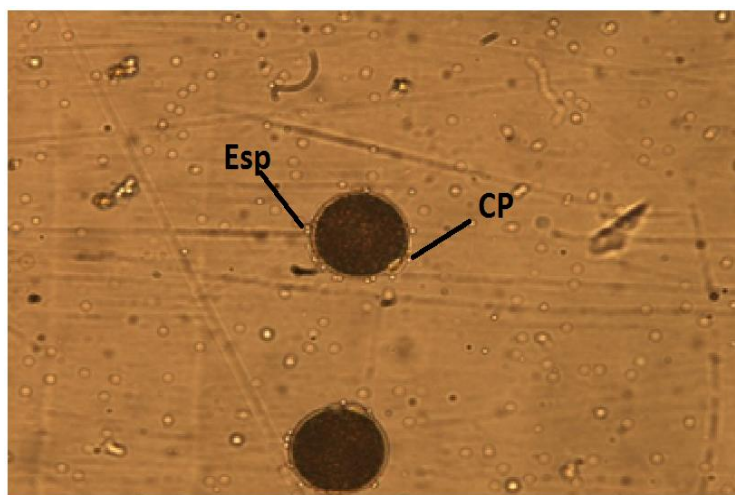


Figura 10: fecundação, observação ao microscópio óptico. CP) corpo polar; Esp) espermatozóides.

3.9. ECLOSÃO

Realizou-se a eclosão em triplicado em copos de 2L com água do mar filtrada e esterilizada por U.V., com salinidade de 30, numa densidade de 60 ovos/mL, durante 24h-48h à temperatura ambiente, até ao aparecimento de larva D. As larvas retidas num crivo de 40 µm foram suspensas em 200mL para posterior avaliação da taxa de eclosão larvar. Avaliou-se taxa de eclosão larvar através da contagem do número de larvas anormais versus as larvas normais em 3 amostras de 1mL.

3.10. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente atendendo aos objectivos do presente estudo. Os dados expressos em percentagem foram modificados pela transformação arcoseno ($\arcsin \sqrt{y}$), para se poder assumir uma distribuição normal e homogeneidade das variâncias, permitindo a comparação estatística (Maroco, 2007).

Para a comparação das amostragens das variáveis independentes realizou-se testes paramétricos e não paramétricos. Após se garantir as condições dos testes paramétricos, aplicou-se o Método de Análise de variâncias (ANOVA) e quando tal não se sucedeu, usou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis como alternativa a ANOVA.

As comparações múltiplas entre pares foram executadas com o teste paramétrico Tukey ou o teste não paramétrico Dunn's para detetar as diferenças significativas entre amostras consecutivas.

A variabilidade ou não dos parâmetros é explicada pelas hipóteses estabelecidas. Quando a hipótese é nula não existem diferenças significativas entre os parâmetros para um nível de significância de 5% ($p > 0,05$).

Para avaliar a relação entre os parâmetros estudados, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson e de Spearman. Foram determinados os coeficientes de correlação e os respectivos níveis de significância entre os parâmetros ambientais, índice de condição, índice gonadal, bioquímica dos progenitores (adultos), bioquímica dos ovócitos e larvas. Das relações encontradas com um intervalo de confiança superior a 95% ($p > 0,05$) e que revelaram interesse para o estudo, foram representadas sobre o modelo estatístico de regressão linear $y = a + bx$.

O tratamento estatístico foi efetuado com o auxílio dos softwares Microsoft Office Excel 2007 e SigmaStat 3.5 (2006).

4. RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS AMBIENTAIS

Na figura seguinte, encontra-se representado a variação da temperatura da água nos dois locais de amostragem (Rio Sado e Ria de Alvor) ao longo do período de estudo.

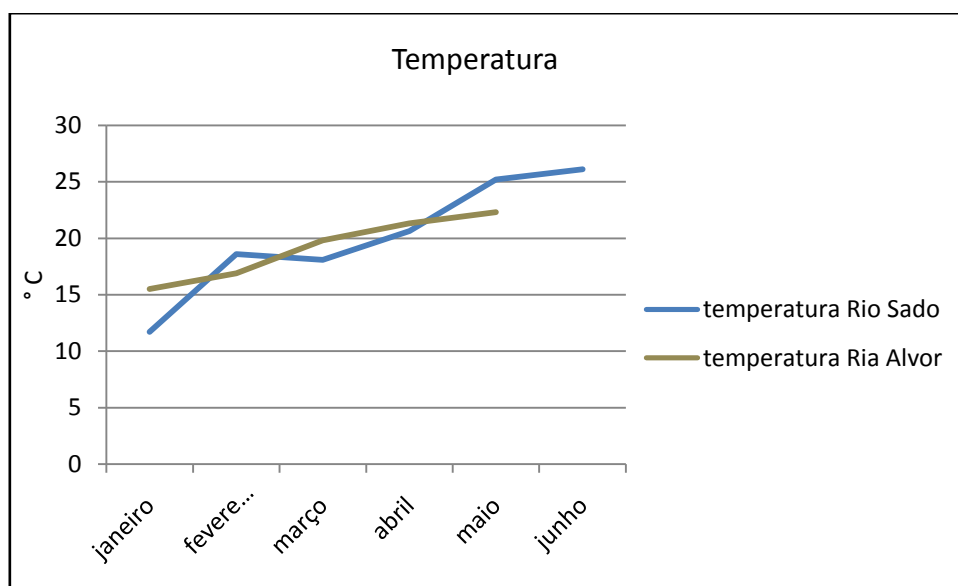


Figura 11: Variação média mensal da temperatura da água (°C) ao longo do período de amostragem no Rio Sado e na Ria de Alvor.

Pela análise da figura, verificou-se uma subida da temperatura ao longo da amostragem com o valor mínimo a ser registado em janeiro nos dois pontos de amostragem (Rio Sado - 11,7° e Ria de Alvor - 15,5°), e os máximos em junho no Rio Sado (26,1°) e em maio na ria de Alvor (22,3°).

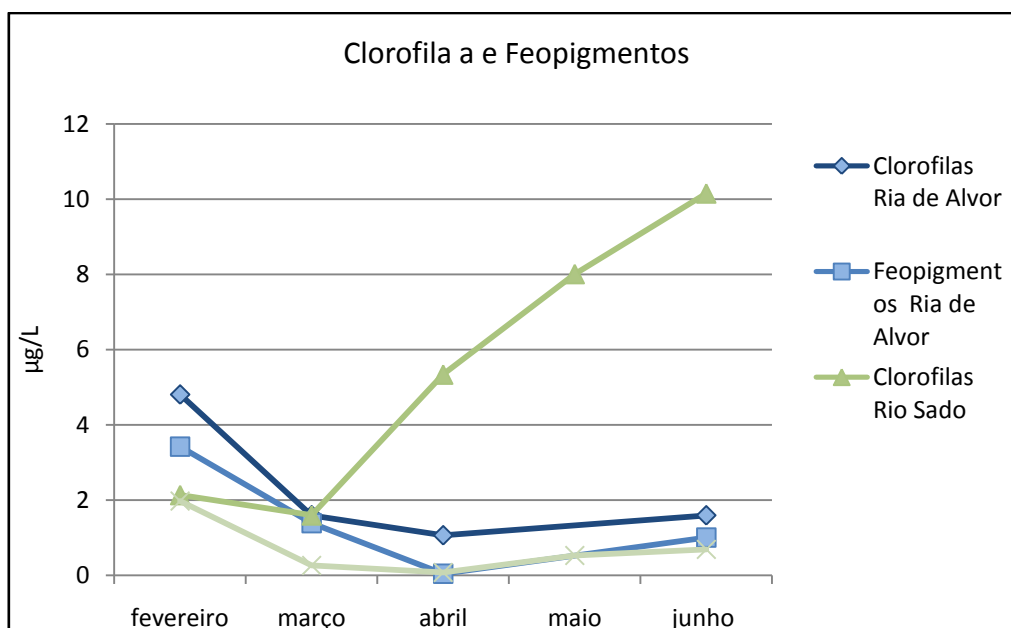


Figura 12: Variação mensal da concentração de clorofila *a* (µg/L) e feopigmentos (µg/L) ao longo do período de amostragem.

Tabela 2: Variação mensal das concentrações de sólidos suspensos totais (SST -mg/L) e matéria orgânica (M.O.-%) da água ao longo do período de amostragem.

	Rio Sado		Ria de Alvor	
	SST (mg/l)	M.O. %	SST (mg/l)	M.O. %
janeiro				
fevereiro	54,2	7,6	36,75	7,75
março	28	8	18,1	7,62
abril	28,6	8,76	17	7,19
maio	37,38	5,95		
junho	34,60	4,83	19,2	4,95

No caso da Ria de Alvor, verificou-se um decréscimo das concentrações de clorofila *a* e feopigmentos até ao mês de abril, onde se registou o valor mais baixo, (Figura 12). No rio Sado existe um ligeiro decréscimo entre fevereiro (2,14 µg/L) e março (1,60 µg/L) , seguindo-se um aumento acentuado nos valores de clorofila *a* até ao final da amostragem (10,15 µg/L) . Relativamente aos sólidos suspensos totais

(Tabela 2), verifica-se uma maior concentração no Rio Sado no mês de fevereiro (54,2 mg/L), e um menor valor no mês de março (28 mg/L). Na Ria de Alvor registou-se igualmente o valor mais elevado no mês de fevereiro (36,75 mg/L) e o menor em abril (17 mg/L). A matéria orgânica (Tabela 2) apresenta um valor mais elevado no Rio Sado em abril (8,76 %) e na Ria de Alvor em fevereiro (7,75%).

A temperatura da água do Rio Sado correlaciona-se positivamente com a clorofila *a* ($p=0,00286$), verificando-se uma aumento da concentração da clorofila *a* à medida da subida da temperatura, atingindo ambos os parâmetros um valor máximo no mês de junho. Na Ria de Alvor a temperatura da água é correlacionada negativamente com os feopigmentos ($p=0,0408$).

4.2. ÍNDICE DE CONDIÇÃO

Para análise dos resultados referentes ao índice de condição (Figura 13), observa-se uma ligeira superioridade da população proveniente do Rio Sado, de fevereiro a maio, obtendo neste último mês o pico máximo (4,55). A população da Ria de Alvor, atingiu o seu maior de índice de condição (4,51) no mês de junho.

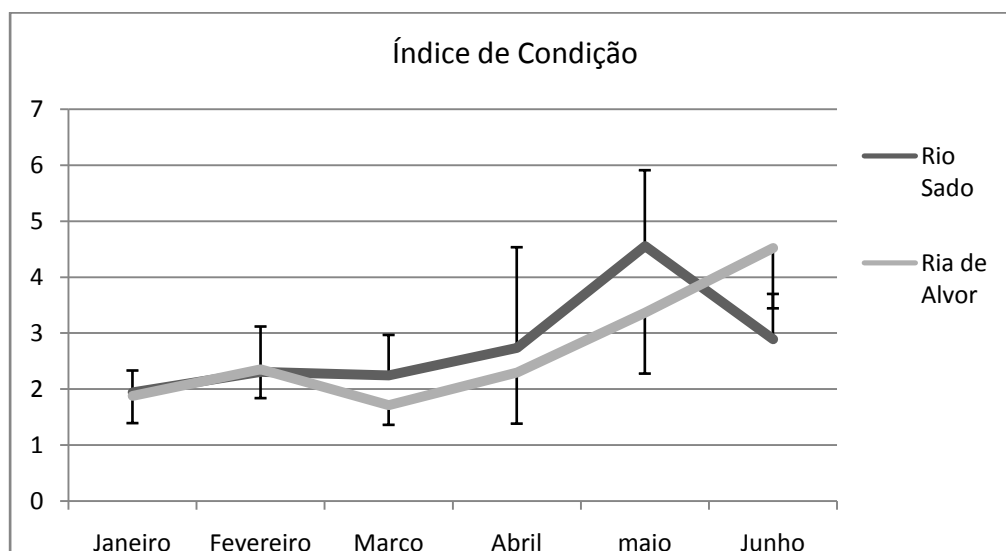


Figura 13: Variação média (\pm desvio padrão) mensal do índice de condição de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem, nas populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

Contudo, estas diferenças entre as populações, não foram estatisticamente significativas (K-W., $H=0,595$ d.f.=1, $p=0.440$). Na população de Alvor, verificou-se a existência de diferenças significativas (K-H., $H=41,279$ d.f.=5 $p < 0,001$), em todos os meses de amostragem, exceto entre maio e junho ($p > 0,05$). Não se verificou a existência de diferenças significativas entre amostragens para a população do Rio Sado (K-H., $H=9,970$ d.f.=5 $p=0,076$) O índice de condição correlaciona-se negativamente com os sólidos suspensos voláteis ($p=0,0071$).

4.3. RÁCIO DE SEXOS

Nos primeiros meses de amostragem, observou-se uma percentagem considerável de indivíduos com o sexo indeterminado, na população da Ria de Alvor (53% no mês de janeiro) (Figura 14). De uma maneira geral, o rácio entre fêmeas e machos é equilibrado para as duas populações (Ria de Alvor - 42% de fêmeas vs 45% de machos; Rio Sado - 52% de fêmeas vs 47% de machos).

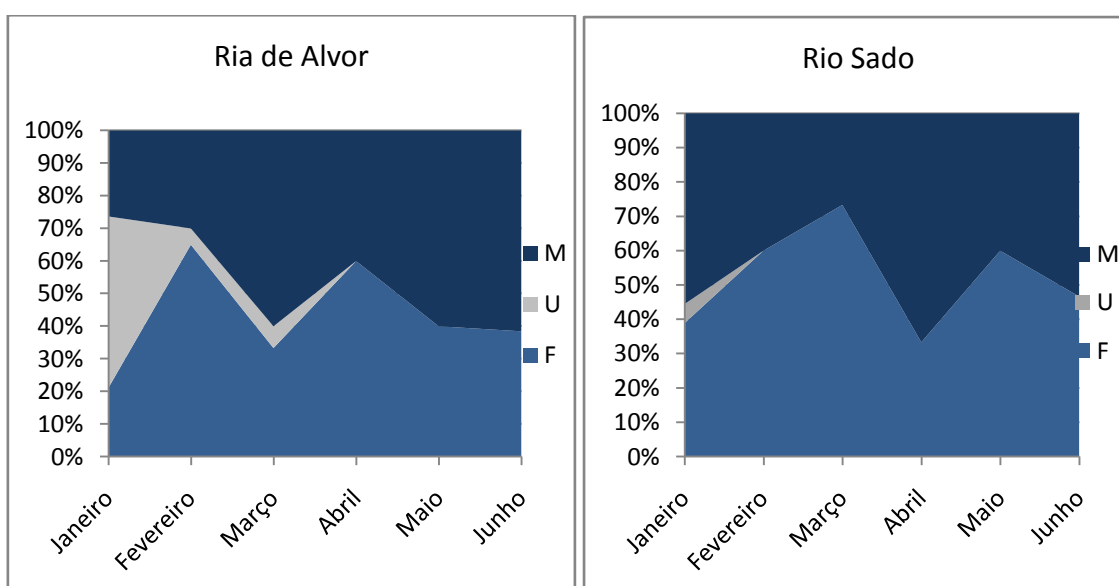


Figura 14: Variação média mensal do rácio de sexos ao longo do período de amostragem para as populações da Ria de Alvor e do Rio Sado (M- indivíduos do sexo masculino F- indivíduos do sexo feminino U- indivíduos de indeterminados).

4.4. CICLO REPRODUTIVO

Durante o período de amostragem, verificou-se que na população da Ria de Alvor, o mês de janeiro registou o maior número de indivíduos indeterminados (53%), observando-se a partir deste um acréscimo dos estados de maturação das gónadas, sendo que no mês de junho esta população registou os valores mais elevados de maturação com aproximadamente 13% em fase de reabsorção pós postura de maturação (Figura 15).

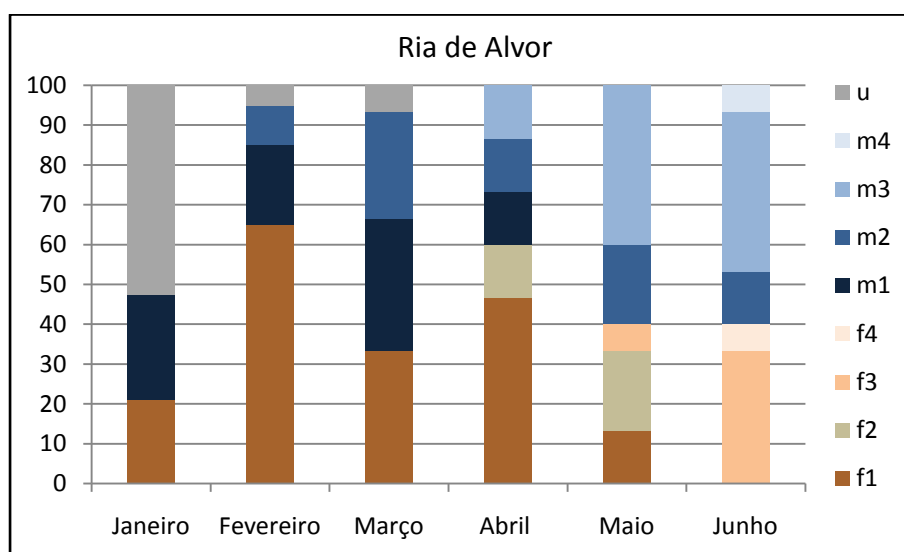


Figura 15: Variação mensal da percentagem de cada estado de maturação da gónada para a população proveniente da Ria de Alvor. (U- estado de repouso; f1- fêmeas em fase de multiplicação das células germinativas; f2- fêmeas em fase de desenvolvimento e maturação dos gâmetas; f3- fêmeas em fase de gâmetas maduros; f4- fêmeas em fase de reabsorção; m1- machos em fase de multiplicação das células germinativas; m2- machos em fase de desenvolvimento e maturação dos gâmetas; m3- machos em fase de gâmetas maduros; m4- machos em fase de reabsorção).

Durante o período de amostragem verificou-se que, na população do Rio Sado que no mês de janeiro foram registados os estados de maturação mais baixos, com aproximadamente 89% da população na fase de multiplicação das células germinativas, observando-se a partir deste mês um acréscimo dos estados de maturação, sendo que no mês de junho esta população registou os valores mais

elevados de maturação, encontrando-se 20% da população em fase de reabsorção (Figura 16).

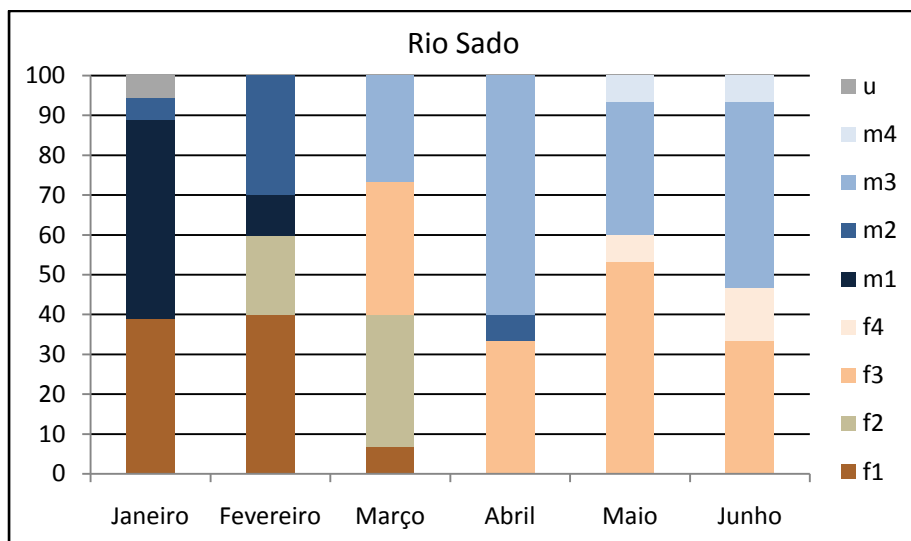


Figura 16: Variação da percentagem de cada estado de maturação da gónada para a população proveniente do Rio Sado. (U- estado de repouso; f1- fêmeas em fase de multiplicação das células germinativas; f2- fêmeas em fase de desenvolvimento e maturação dos gâmetas; f3- fêmeas em fase de gâmetas maduros; f4- fêmeas em fase de reabsorção; m1- machos em fase de multiplicação das células germinativas; m2- machos em fase de desenvolvimento e maturação dos gâmetas; m3- machos em fase de gâmetas maduros; m4- machos em fase de reabsorção).

4.5. ÍNDICE GONADAL

Analisando os valores do índice gonadal das duas populações (Figura 17) verificou-se que os indivíduos provenientes do Rio Sado, apresentam valores superiores nos meses compreendidos de janeiro a abril, sendo que neste mês registou-se o valor mais elevado (3,933), apresentando a partir daí um decréscimo. As ostras da Ria de Alvor igualam as do Rio Sado apenas no mês de maio e junho, atingindo o valor máximo em maio (3,466).

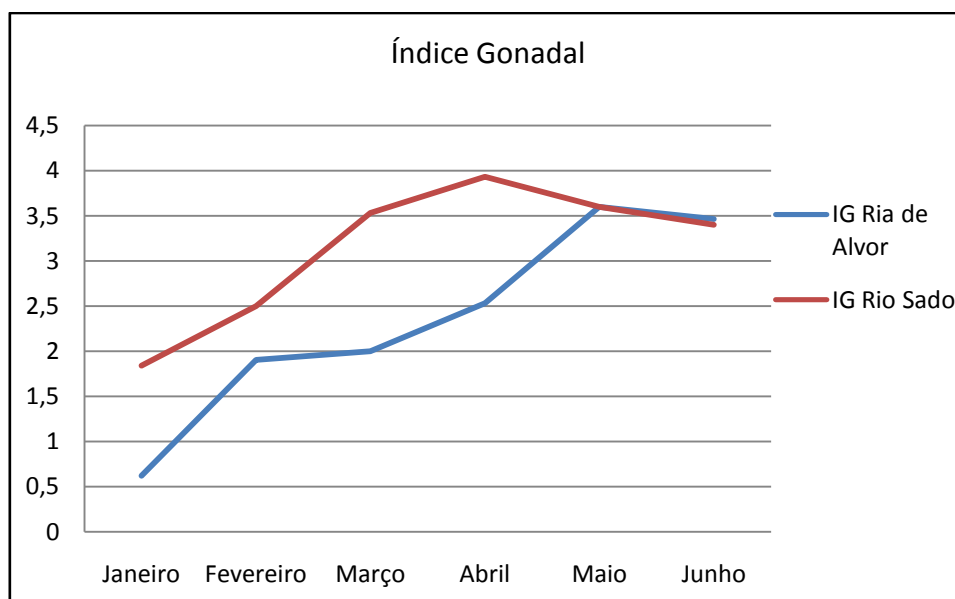


Figura 17: Variação do índice gonadal total das populações do Rio Sado e da Ria de Alvor, ao longo do período da amostragem, (IG Alvor- índice gonadal da população da Ria de Alvor; IG Sado- índice gonadal da população do Rio Sado).

O Índice gonadal das duas populações difere significativamente ($t=-2,28$ d.f.=22 $p=0,033$).

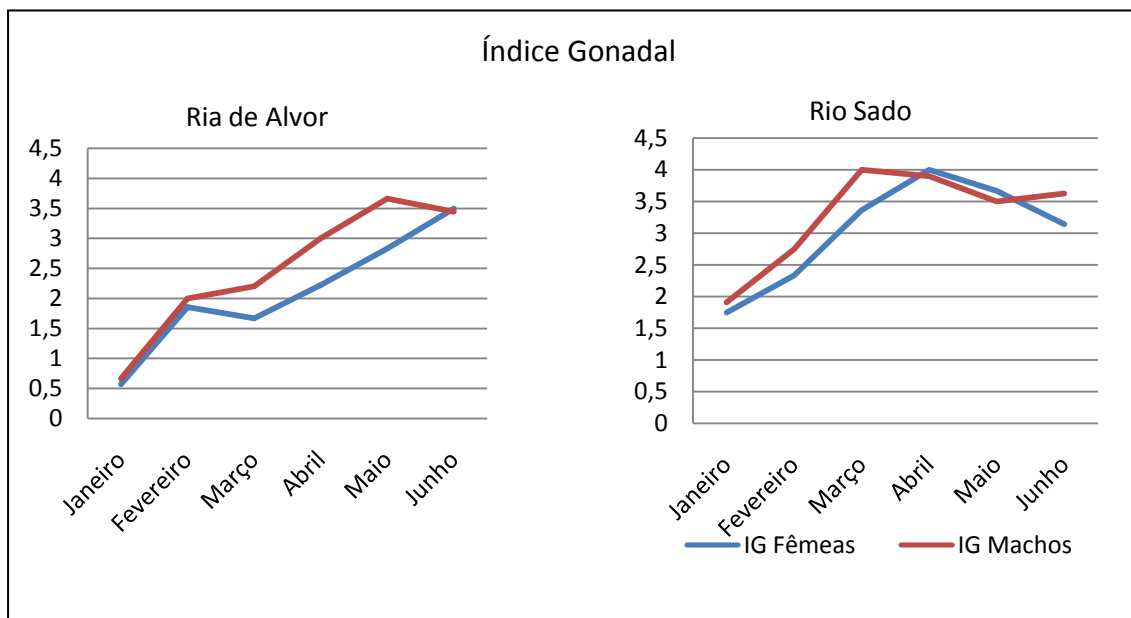


Figura 18: Variação mensal do índice gonadal da população do Rio Sado e da população da Ria de Alvor por género, ao longo do período da amostragem (IG F- Índice gonadal das fêmeas; IG M- índice gonadal dos machos).

Na Ria de Alvor, podemos verificar que os machos apresentaram um índice gonadal superior nos primeiros cinco meses do ano. O valor máximo de maturação nos machos registou-se em maio (3,66) e nas fêmeas em junho (3,5) (Figura 17).

Comparando os indivíduos do sexo masculino com os do sexo feminino do Rio Sado, podemos verificar que os machos apresentam valores ligeiramente superiores nos primeiros 3 meses do ano, atingindo o máximo da maturação no mês de março e no caso das fêmeas o valor mais elevado é atingido no mês seguinte (Figura 18).

Observou-se uma correlação negativa entre o índice gonadal dos indivíduos do Rio Sado e a concentração de feopigmentos. Foi Também encontrada uma correlação negativa entre o índice gonadal dos machos e o índice gonadal total e os sólidos suspensos totais ($p < 0,05$). Para a população da Ria de Alvor, o índice gonadal das fêmeas correlacionou-se positivamente com o índice de condição ($p = 0,0195$), ou seja, de uma forma geral, quando se observou um aumento do índice de condição, verificou-se também um aumento do índice gonadal das fêmeas desta população. Verificou-se, também uma correlação negativa entre o índice gonadal total e das fêmeas e a matéria orgânica suspensa .

4.6. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS ADULTOS

As proteínas foram o constituinte bioquímico mais predominante (14-27 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ peso seco), seguido do glicogénio (3-12 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ peso seco) e lípidos totais (3-8 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ peso seco), para ambas as populações estudadas durante o período de amostragem.

4.6.1. PROTEÍNAS

No conteúdo em proteínas dos adultos verificou-se um acréscimo no mês de março seguido de um decréscimo até ao mês de maio, isto verificou-se para as duas populações. (Figura 19).

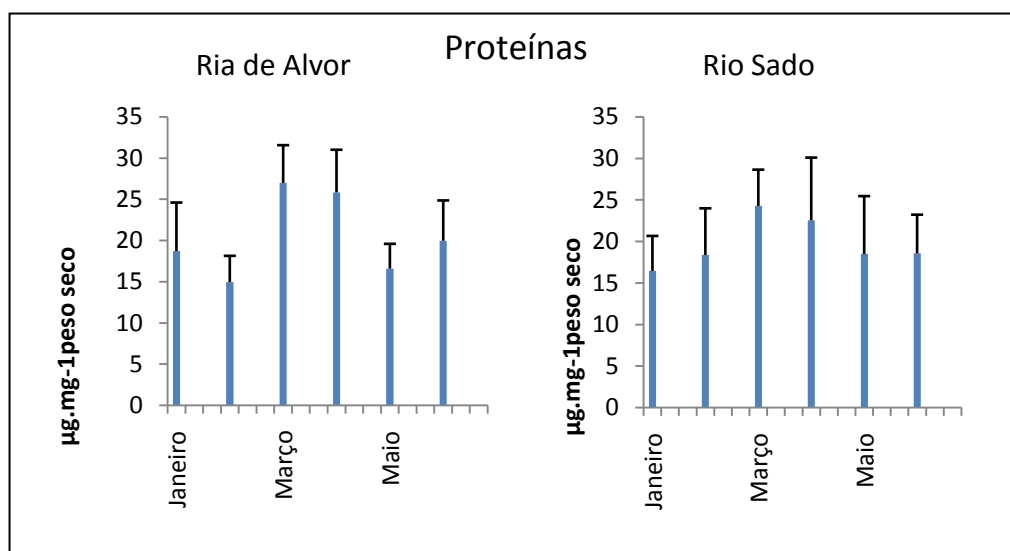


Figura 19: Variação média (\pm desvio padrão) mensal do teor em proteínas ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ peso seco) presente nos reprodutores de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

Os valores máximos foram obtidos no mês de março para os indivíduos das duas populações (Ria de Alvor - $26,99 \mu\text{g.mg}^{-1}$ peso seco e Rio Sado - $24,28 \mu\text{g.mg}^{-1}$ peso seco). Estatisticamente não foram encontradas diferenças significativas entre as duas populações (K-W., $H=1,957$ d.f.=1, $p=0.162$). Na população proveniente da Ria de Alvor ocorreu diferenças significativas entre amostragens (ANOVA $p < 0.001$), exceto nos meses consecutivos de janeiro e fevereiro, março e abril e junho e maio. Na população do Rio Sado verificaram-se, também, diferenças significativas entre amostragens (K-W., $H=29.86$ d.f.=5, $p < 0.001$), exceto nos meses consecutivos de janeiro e fevereiro, março e abril, abril e maio e junho e maio. O conteúdo proteico dos adultos oriundos do Rio Sado correlacionou-se positivamente com o índice gonadal dos machos ($p=0,00278$) e negativamente com os sólidos suspensos totais ($p=0,0167$).

4.6.2. LÍPIDOS TOTAIS

Durante o período de amostragem, não se verificaram diferenças significativas no padrão de variação do teor em lípidos totais entre as duas populações (ANOVA $p=0.373$), (Figura 20).

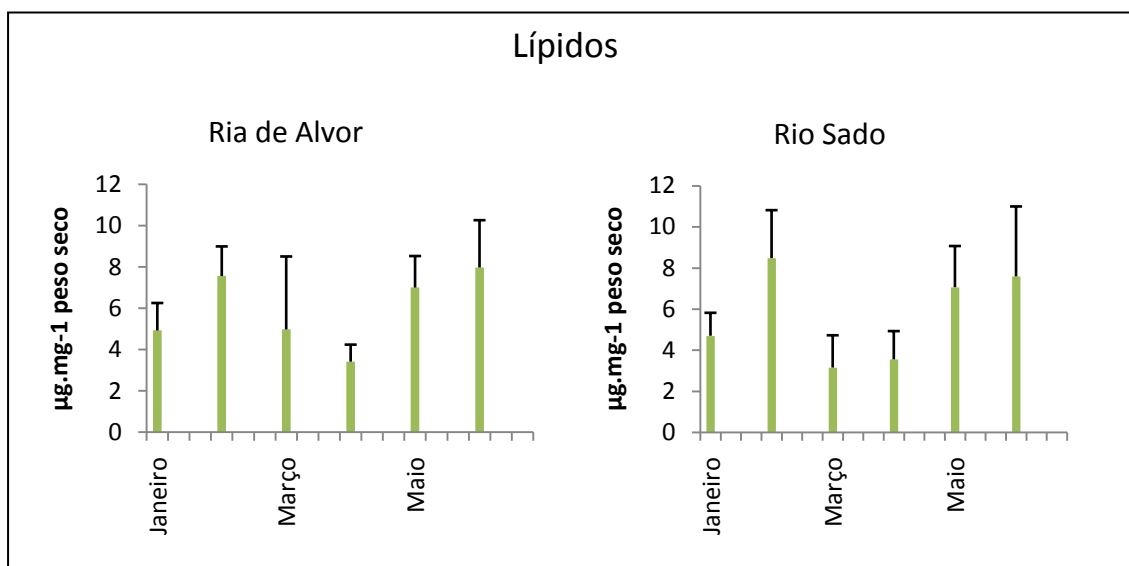


Figura 20: Variação média (\pm desvio padrão) mensal de lípidos totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ peso seco) presente nos reprodutores de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem nas populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

Registou-se um aumento entre janeiro e fevereiro, seguido de um decréscimo até ao mês de Abril, voltando a aumentar até ao último mês da amostragem. Os valores mais baixos foram observados em abril e maio para os indivíduos da Ria de Alvor ($3,41 \pm 0,823 \mu\text{g.mg}^{-1}$ peso seco) e para os do Rio Sado ($3,149 \pm 1,57 \mu\text{g.mg}^{-1}$ peso seco), respectivamente. Na população da Ria de Alvor ocorreram diferenças significativas entre amostragens (K-W., $H=127.012$ d.f.=5, $p<0,001$), excepto nos meses consecutivos de março e abril e maio e junho. Na população do Rio Sado verificaram-se também, diferenças significativas (ANOVA $p<0,001$), exceto entre os meses consecutivos de maio e junho. O conteúdo lipídico dos indivíduos do Rio Sado correlacionou-se negativamente com a concentração de feopigmentos ($p=0,0176$).

4.6.3. GLICOGÉNIO

Ao contrário dos lípidos totais, verificaram-se diferenças significativas no padrão de variação do teor em glicogénio entre as duas populações (ANOVA $p=0,11$) (Figura 21).

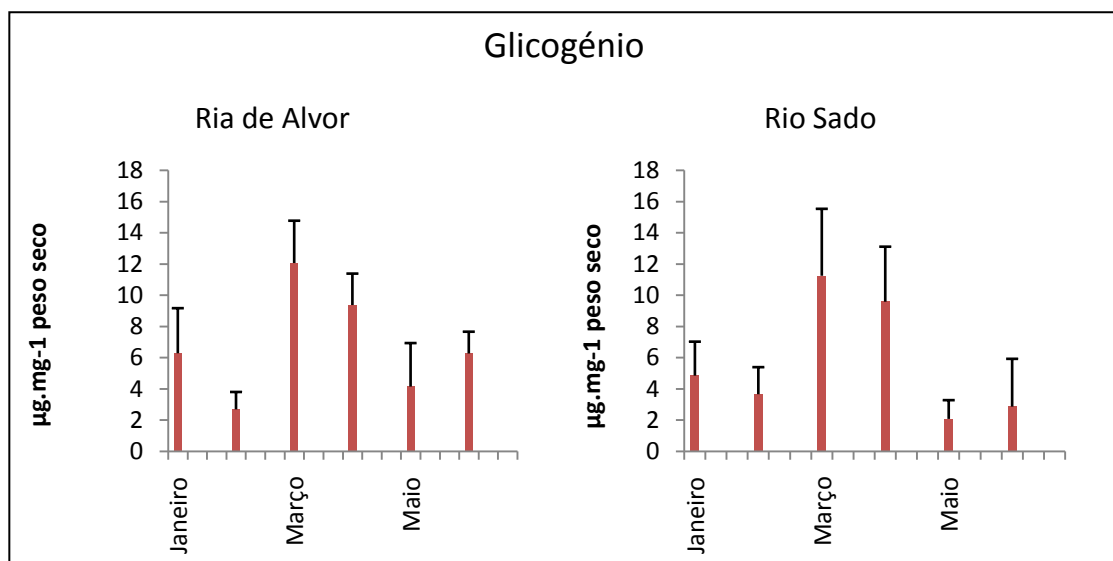


Figura 21: Variação média (\pm desvio padrão) mensal de glicogénio ($\mu\text{g.mg}^{-1}$) presente nos reprodutores de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e de Ria de Alvor.

Na população da Ria de Alvor o valor máximo foi registado no mês de março ($12,06 \pm 2,71 \mu\text{g.mg}^{-1}$ peso seco) e o valor mínimo no mês de maio ($4,15 \pm 2,79 \mu\text{g.mg}^{-1}$ peso seco), para a população proveniente do Rio Sado o valor médio máximo foi também atingido no mês de março ($11,24 \pm 4,288 \mu\text{g.mg}^{-1}$ peso seco) e o valor mínimo no mês de maio ($2,08 \pm 1,20 \mu\text{g.mg}^{-1}$ peso seco). Na população da Ria de Alvor verificaram-se diferenças significativas entre amostragens (K-W., $H=78,92$ d.f.=5, $p<0,001$), excepto nos meses consecutivos de março e abril e maio e junho. Para a população do Rio Sado, verificaram-se também diferenças significativas entre amostragens consecutivas, excepto entre os meses de janeiro e fevereiro, março e abril e maio e junho ($p=0,001$).

O teor em glicogénio e o conteúdo em proteínas das ostras da população da Ria de Alvor correlacionam-se ($p<0,05$). No mês de fevereiro ambos os conteúdos apresentam os valores mais baixos, seguidos dos valores mais altos no mês seguinte. De uma forma geral, nas ostras provenientes do rio Sado, o conteúdo em lípidos correlacionou-se negativamente com o teor em glicogénio ($p=0,0198$), ou seja, o

aumento do conteúdo em lípidos corresponde uma diminuição do conteúdo em glicogénio e vice-versa. Esta correlação foi notória nos meses de março e abril, quando se registaram os valores máximos de glicogénio e os mínimos de lípidos totais.

4.6.4. CONTEÚDO ENERGÉTICO TOTAL

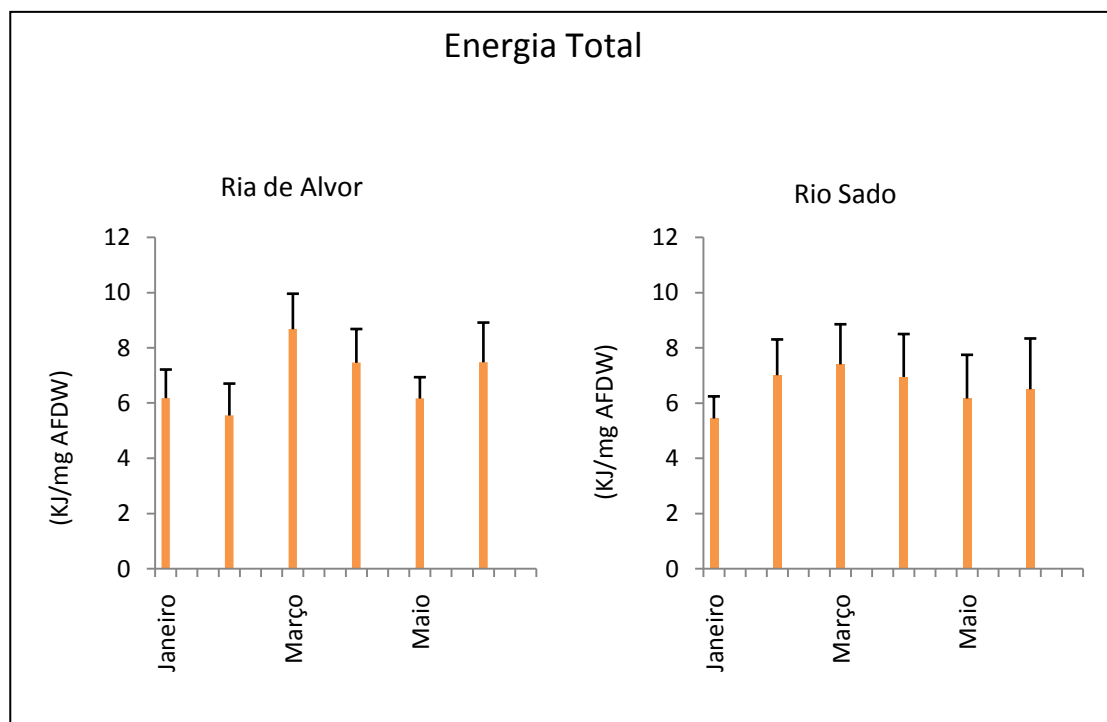


Figura 22: Variação média (\pm desvio padrão) mensal do conteúdo energético (KJ/mg peso seco) presente nos reprodutores de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

Em ambas as populações, os valores do conteúdo energético mantiveram-se praticamente constantes ao longo do período de amostragem (Figura 22). A população da Ria de Alvor apresentou o valor energético mínimo ($5,55 \pm 1,16$ KJ/mg peso seco) no mês de fevereiro e o máximo no mês de maio ($8,68 \pm 1,29$ KJ/mg peso seco). Na população do Rio Sado, o valor energético mínimo foi observado no mês de janeiro ($5,45 \pm 0,80$ KJ/mg peso seco) e o valor médio mais elevado ($7,41 \pm 1,45$ KJ/mg peso seco) em março. De acordo com a análise estatística verifica-se que existem diferenças significativas entre as duas populações (K-W., $H=4,665$ d.f.=5, $p=0,031$). Na população de Alvor observou-se diferenças significativas entre amostragens com exceção dos meses consecutivos de janeiro e fevereiro (ANOVA $p <$

0,001). Nos indivíduos provenientes do Rio Sado verificou-se igualmente diferenças significativas nos meses consecutivos de janeiro e fevereiro (Anova $p < 0,001$). O conteúdo energético das ostras da Ria de Alvor correlaciona-se positivamente com o seu conteúdo proteico.

4.7. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS OVÓCITOS

Durante o período de amostragem, iniciou-se a recolha dos ovócitos no mês de março na população proveniente do Rio Sado e no mês de junho, na população da Ria de Alvor (altura em que a fecundidade das fêmeas o permitiu).

As proteínas foram o constituinte bioquímico mais predominante nos ovócitos (Rio Sado - 10,5-49,1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco; Ria de Alvor - 14,8-28,62 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco), seguido dos lípidos totais (Rio Sado - 3,5-10,8 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco; Ria de Alvor - 6,6-11,7 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco) e hidratos de carbono (Rio Sado - 0.8-3.1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco; Ria de Alvor - 1,32-2,9 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco).

4.7.1. PROTEÍNAS

O conteúdo em proteínas nos ovócitos apresentou o seu valor máximo no mês de maio ($29,02 \pm 4,41 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco) e o mínimo no mês de junho ($15,75 \pm 3,46 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco) nos indivíduos do Rio Sado (Figura 23). Este constituinte manteve-se relativamente elevado nos primeiros 3 meses de amostragem tendo diminuído no último mês. Estatisticamente, verificou-se que para a população da Ria de Alvor existiram diferenças significativas entre as amostragens (K.W., $H=49,53$ d.f.=3, $p < 0,001$), nomeadamente nos meses de junho com todos os outros e entre fêmeas por período de amostragem nos meses de abril ($p < 0,001$), maio ($p = 0,003$) e junho ($p < 0,001$). Verificou-se também que existiram diferenças significativas entre as duas populações no mês de junho (K.W., $H=25,67$ d.f.=1, $p < 0,001$).

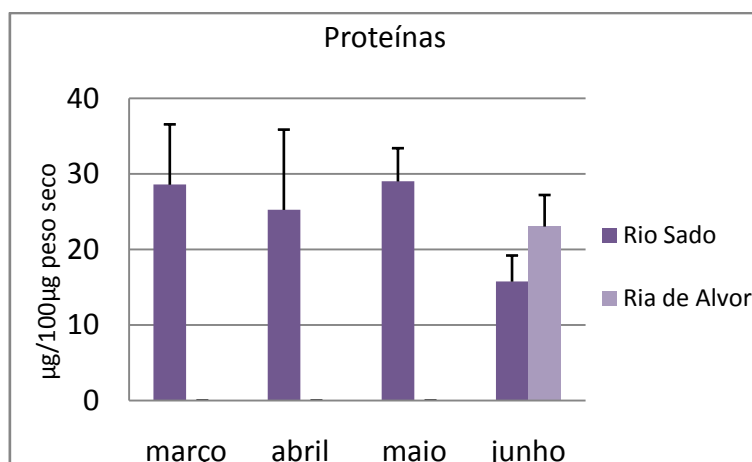


Figura 23: Variação média (\pm desvio padrão) de proteínas ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco) presentes nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem nas populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

4.7.2. HIDRATOS DE CARBONO

Durante o período de amostragem não foram observados grandes oscilações deste teor com exceção do mês de junho, altura em que se registou o valor mínimo para a população do Rio Sado ($1,59 \pm 0,49 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco) (Figura 24).

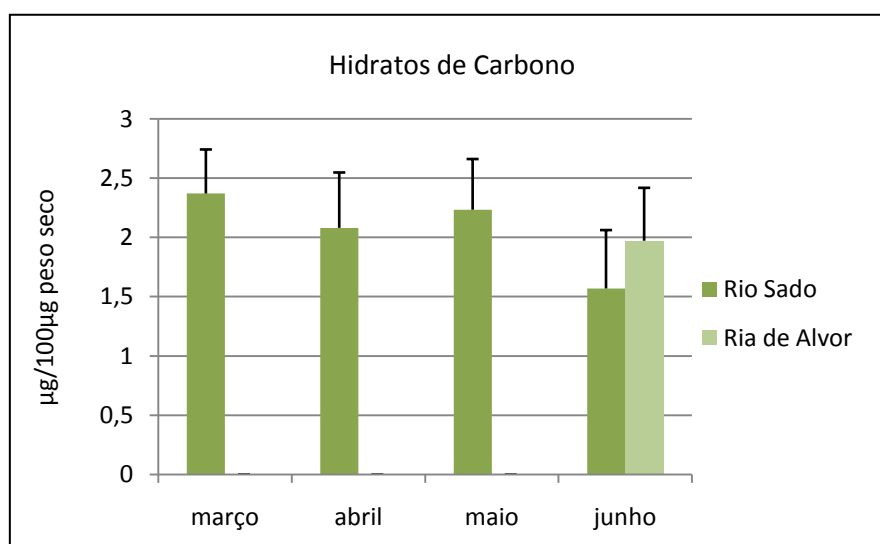


Figura 24: Variação média (\pm desvio padrão) do conteúdo em hidratos de carbono ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco) presentes nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem nas populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

O valor máximo foi registado em março ($2,37 \pm 0,37 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco). Estatisticamente verificou-se que na população do Rio Sado existiram diferenças significativas entre as amostragens (ANOVA $p < 0,001$), o mês de junho foi diferente de todos os outros e entre fêmeas nos meses de abril ($p = 0,004$) e junho ($p < 0,001$). Verificou-se a existência de diferenças significativas entre as duas populações para o mês de junho (ANOVA $p = 0,002$). Na Ria de Alvor, verificou-se também a existência de diferenças significativas entre fêmeas ($p < 0,001$). O conteúdo de hidratos de carbono presentes nos ovócitos correlaciona-se positivamente com o conteúdo em proteínas ($p = 0,0274$) nos ovócitos da população do Rio Sado. Esta correlação é evidente, correspondendo os valores mais altos e mais baixos no mesmo período de amostragem, março e junho, respetivamente.

4.7.3. LÍPIDOS TOTAIS

Através da análise da Figura 25, verificou-se que o mês onde se registou o valor mais elevado para a população do Rio Sado foi abril ($9,50 \pm 0,987 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco), seguido de um decréscimo até ao mês de junho, amostragem onde se registou o valor mais baixo ($6,043 \pm 1,66 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco). Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre amostragens na população do Rio Sado (ANOVA $p < 0,001$), com relevância para os meses consecutivos de março e abril e maio e junho e, não existindo porém diferenças significativas entre fêmeas por dentro da mesma amostragem ($p > 0,05$). As duas populações diferem significativamente relativamente ao conteúdo em lípidos totais dos ovócitos no mês de junho (ANOVA $p < 0,001$).

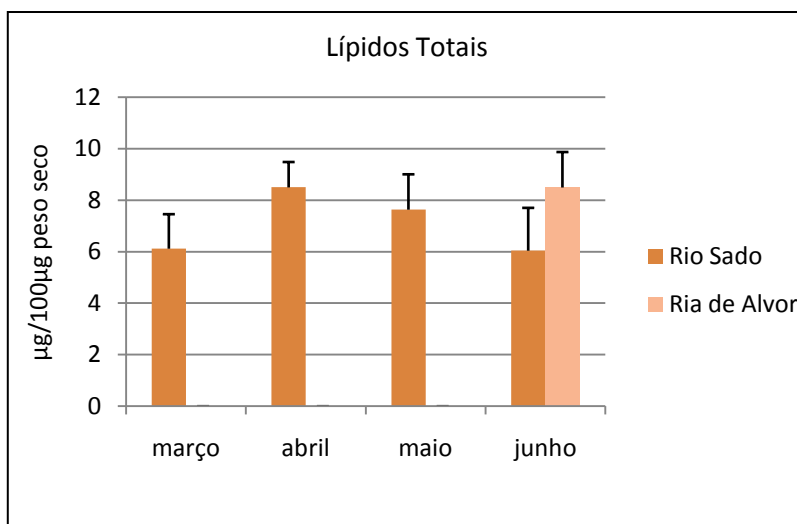


Figura 25: Variação média (\pm desvio padrão) mensal dos lípidos totais ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco) presente nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

4.7.4. AÇÚCARES REDUTORES LIVRES E POLISSACARÍDEOS

A variação da composição dos hidratos de carbono em açúcares redutores livres e polissacarídeos dos ovócitos, ao longo do período de amostragem, encontra-se representada na Figura 26.

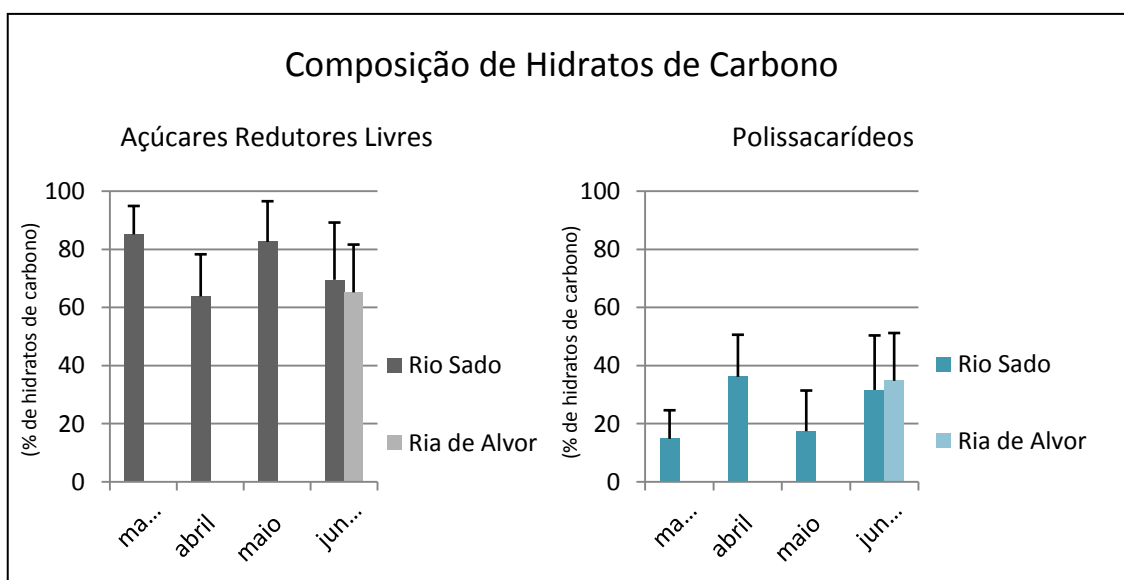


Figura 26: Variação média (\pm desvio padrão) mensal da percentagem relativa de açúcares redutores livres e polissacarídeos na composição de hidratos de carbono presentes nos

ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

Os açúcares redutores livres representaram a maior fração dos hidratos de carbono, registando-se a percentagem mais elevada no mês de março ($85,1 \pm 9,78$ %) e a percentagem a mais reduzida no mês de abril ($63,8 \pm 14,5$ %). Estatisticamente, foram observadas diferenças significativas entre amostragens na população do Rio Sado (ANOVA, $p=0,002$) com relevância para os meses consecutivos de março e abril e maio e junho, existindo também diferenças significativas entre fêmeas nos meses de abril ($p=0,011$) e maio ($p=0,014$). Não se verificou diferenças significativas entre as duas populações no mês de junho (K.W., $H=1,208$ d.f.=1, $p=0,272$). Na população da Ria de Alvor foram observadas diferenças significativas entre fêmeas no mês de junho (ANOVA, $p<0,001$). O conteúdo em açúcares redutores livres e em hidratos de carbono dos ovócitos correlacionou-se positivamente com o conteúdo em proteínas dos ovócitos ($p<0,05$).

Relativamente aos polissacarídeos, a percentagem média mais elevada foi registada no mês de abril ($36,17 \pm 14,5$ %) e a percentagem mais baixa em março ($14,9 \pm 9,78$). Estatisticamente, verificou-se que para a população do Rio Sado existiram diferenças significativas entre as amostragens (ANOVA, $p=0,002$) nos meses consecutivos de abril e março e maio e junho. Observou-se também a existência de diferenças significativas entre fêmeas nos meses de abril ($p=0,043$), maio ($p=0,003$) e junho ($p=0,009$). Não existiram diferenças significativas entre as duas populações no mês de junho (ANOVA $p=0,186$).

4.7.5. LÍPIDOS NEUTROS E FOSFOLÍPIDOS

A variação da composição dos lípidos totais em lípidos neutros e fosfolípidos ao longo do período de amostragem encontra-se representado na Figura 27:

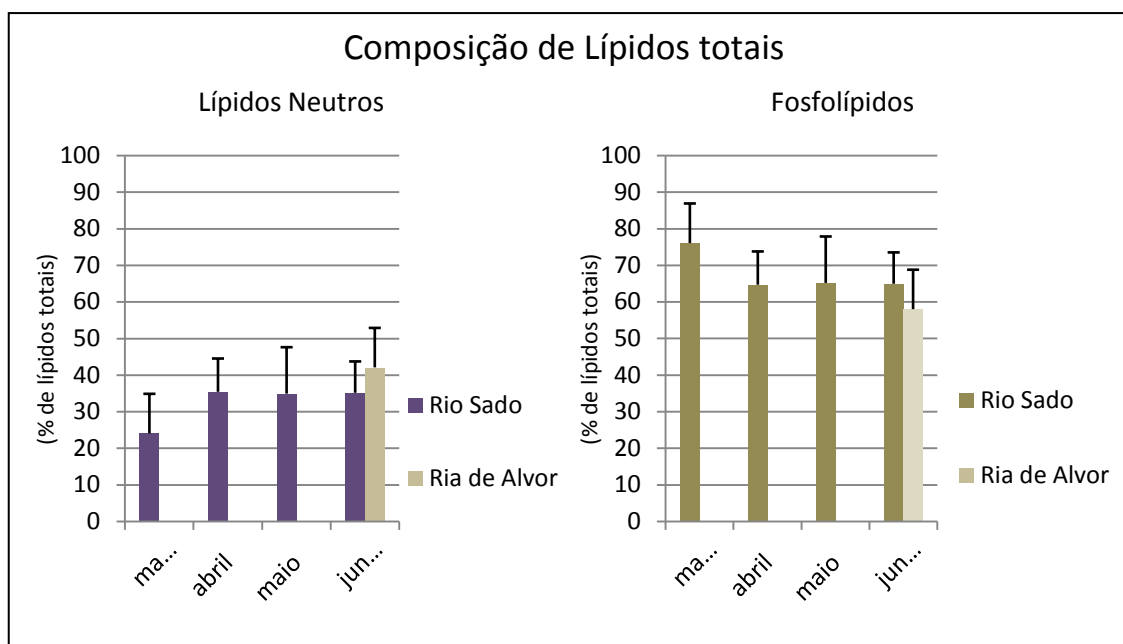


Figura 27: Variação média (\pm desvio padrão) mensal da percentagem relativa de lípidos neutros e fosfolípidos na composição de lípidos totais presentes nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

Verificou-se um acréscimo nas percentagens de lípidos neutros nos ovócitos, no segundo mês de amostragem e uma estabilização nos meses posteriores. A percentagem média máxima foi atingida no mês de abril ($35,37 \pm 9,10$ %) e a mínima em março ($23,99 \pm 10,83$ %). Verificou-se diferenças significativas entre amostragens na população do Rio Sado (ANOVA $p < 0,001$), sendo o mês de março diferente de todos os outros. Observou-se a existência de diferenças significativas entre fêmeas no mês de junho ($p < 0,001$) e entre as duas populações no mês de junho (ANOVA, $p = 0,002$).

Inversamente ao conteúdo em lípidos neutros dos ovócitos, nos fosfolípidos a percentagem média mais elevada ocorreu no mês de março ($76,01 \pm 10,83$ %) e a percentagem média mais baixa no mês de abril ($64,63 \pm 9,10$ %). Estatisticamente, e à semelhança do que ocorreu no conteúdo em lípidos neutros, verificou-se diferenças significativas entre amostragens na população do Rio Sado (ANOVA $p < 0,001$), sendo o mês de março diferente de todos os outros. Observou-se a existência de diferenças significativas entre fêmeas no mês de junho ($p < 0,001$). Relativamente aos fosfolípidos, as duas populações diferem significativamente no mês de junho (ANOVA $p = 0,002$).

4.7.6. MATÉRIA ORGÂNICA TOTAL

Representado na figura 28 estão os resultados relativos à matéria orgânica dos ovócitos, ao longo do período de amostragem, que resulta da soma das proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais.

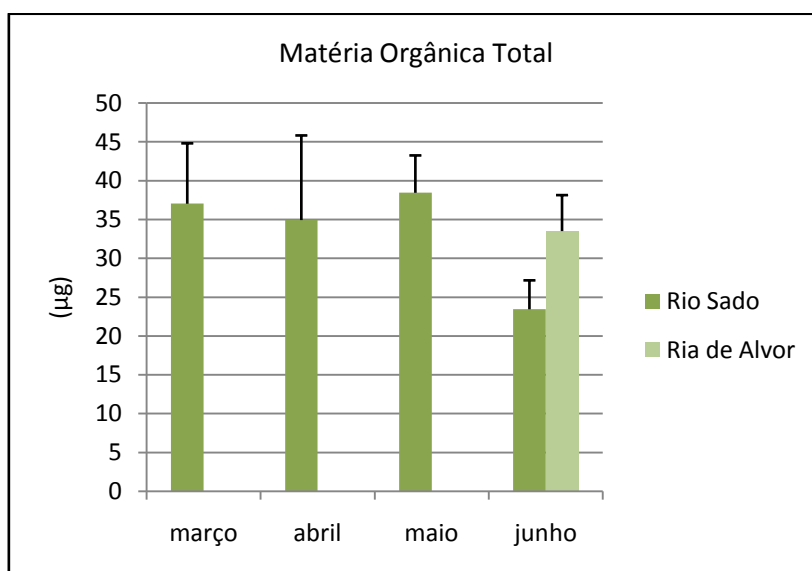


Figura 28: Variação média mensal (\pm desvio padrão) da matéria orgânica total (μg) presente nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

Os valores de matéria orgânica dos ovócitos da população do Rio Sado mantiveram-se estáveis nas primeiras três amostragens registando-se o valor mais elevado no mês de maio ($38,45 \pm 4,81 \mu\text{g}$) e o valor mais baixo no mês de junho ($23,44 \pm 3,73 \mu\text{g}$). Comparando as duas populações no mês de junho, verificou-se que os ovócitos das ostras com origem na Ria de Alvor registaram valores mais elevados ($33,44 \pm 0,92 \mu\text{g}$) de matéria orgânica.

Através da análise estatística dos dados obtidos, verificou-se que existem diferenças significativas entre amostragens (ANOVA $p < 0,001$), nos meses consecutivos de maio e junho. No mês de junho ocorreram também diferenças significativas entre fêmeas para ambas as populações (Sado - $p = 0,031$; Alvor - $p = 0,006$, sendo as populações significativamente diferentes entre si (ANOVA $p < 0,001$). O conteúdo em

matéria orgânica dos ovócitos das ostras do Rio Sado correlacionou-se positivamente com o conteúdo em proteínas ($p=0,0403$), hidratos de carbono ($p=0,0488$) e açúcares redutores livres dos ovócitos ($p=0,0465$).

4.7.7. CONSTITUINTES DA MATÉRIA ORGÂNICA

As percentagens relativas em termos de matéria orgânica dos vários constituintes bioquímicos (proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais) dos ovócitos, ao longo do período de amostragem estão representadas na Figura 29.

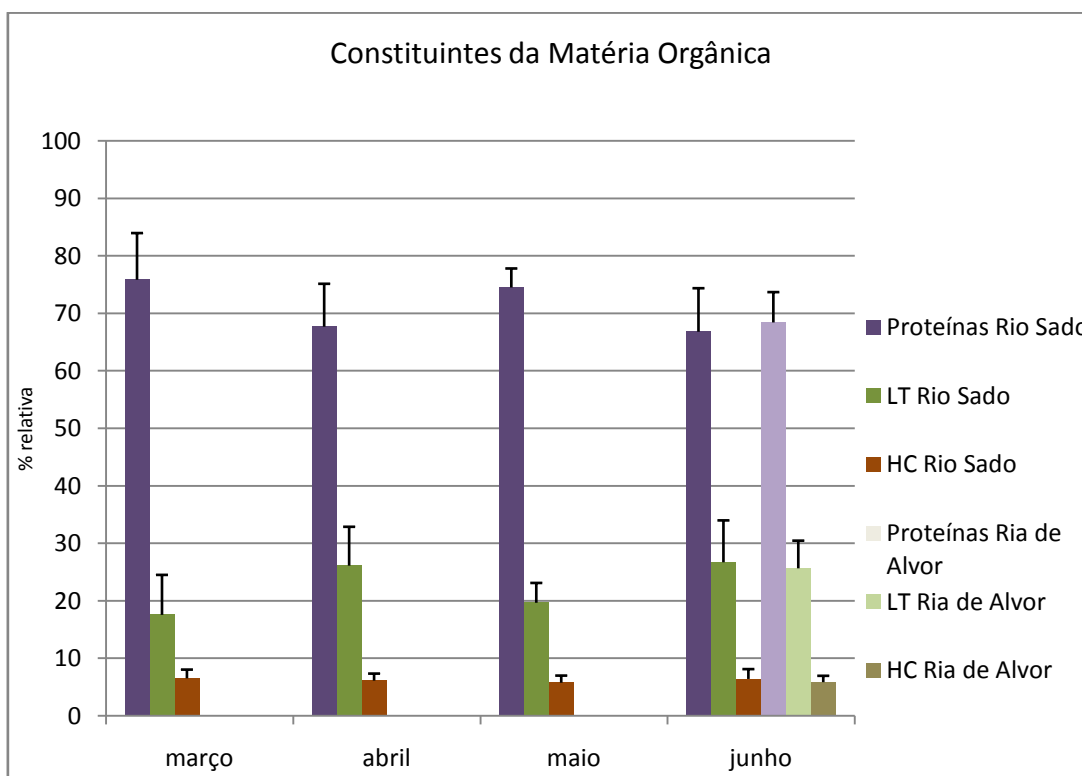


Figura 29: Variação média (\pm desvio padrão) da percentagem relativa em termos de matéria orgânica de proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais presentes nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

As proteínas foram o constituinte com maior percentagem relativa em ambas as populações, verificando-se a percentagem máxima no mês de março ($75,85 \pm 8,12$ %) e a mínima no mês de junho ($66,81 \pm 7,57$ %), para a população do Sado. Na população do Rio Sado, os lípidos totais dos ovócitos atingiram a percentagem máxima no mês de

junho ($26,73 \pm 7,29$ %) e a mínima no mês de março ($17,59 \pm 6,95$ %). No caso dos hidratos de carbono, a percentagem máxima ocorreu em março ($6,55 \pm 1,52$ %) e a mínima em maio ($5,80 \pm 1,24$ %). Os resultados da análise estatística para a percentagem de proteína mostraram diferenças significativas entre amostragens (ANOVA $p < 0,001$), nos meses consecutivos de março e abril e maio e junho, não existindo diferenças significativas entre as duas populações no mês de junho (K.W., $H = 0,216$ d.f.=1, $p = 0,642$).

As fêmeas da população do Rio Sado apresentaram diferenças significativas entre si, relativamente à percentagem relativa de proteínas nos ovócitos nos meses de abril (ANOVA $p = 0,016$) e junho (ANOVA $p = 0,044$). Estas diferenças não foram observadas nas fêmeas da população proveniente da Ria de Alvor. Para a percentagem relativa de lípidos totais dos ovócitos, verificou-se diferenças significativas entre amostragens (ANOVA $p < 0,001$) nos meses consecutivos de março e abril e de maio e junho, não existindo diferenças significativas entre as duas populações no mês de junho (ANOVA $p = 0,710$). Não se observou diferenças significativas entre fêmeas por amostragem para este componente ($p > 0,05$) quer na população do Rio Sado quer na população da Ria de Alvor. No que diz respeito à percentagem de hidratos de carbono, estatisticamente não foram observadas diferenças entre amostragens na população do Rio Sado (ANOVA $p = 0,544$), assim como não se verificaram diferenças significativas entre populações no mês de junho (ANOVA $p = 0,373$). Não ocorreram diferenças significativas entre fêmeas na mesma amostragem ($p > 0,05$) para ambas as populações.

4.7.8. CONTEÚDO ENERGÉTICO TOTAL

A variação do conteúdo energético total dos ovócitos segue a mesma tendência que os principais constituintes bioquímicos (Figura 30).

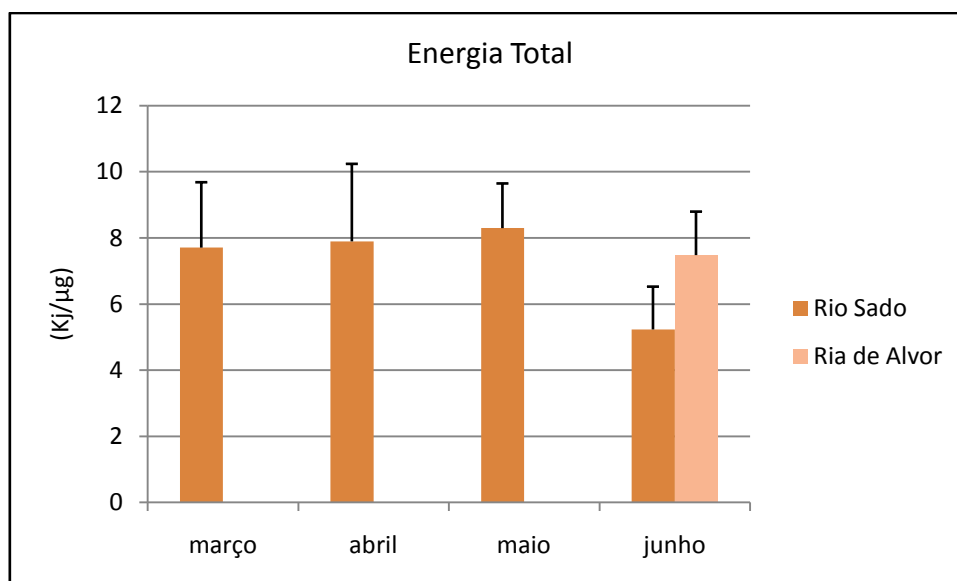


Figura 30: Variação média (\pm desvio padrão) do conteúdo energético total (Kj/ μ g) presente nos ovócitos de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

De uma forma geral manteve-se estável nas primeiras amostragens diminuindo na amostragem de junho que corresponde ao valor mais baixo ($5,23 \pm 1,29$ Kj/ μ g), registando-se o valor mais alto no mês de maio ($8,30 \pm 1,35$ Kj/ μ g) para a população do Rio Sado. Estatisticamente verificou-se diferenças significativas (ANOVA $p < 0,001$) nos meses consecutivos de maio e junho, entre populações para o mês de junho (ANOVA, $p < 0,001$) e entre fêmeas da mesma amostragem no mês de abril para a população do Rio Sado (ANOVA, $p = 0,004$) e no mês de junho (ANOVA, $p = 0,005$) na população da Ria de Alvor. O conteúdo energético total dos ovócitos correlacionou-se positivamente com o conteúdo em proteínas (0,00403) e o conteúdo em matéria orgânica (0,0104) dos ovócitos.

4.8. FECUNDIDADE DAS FÊMEAS

Apenas no mês de março para as fêmeas do Rio Sado e no mês de junho para as fêmeas da Ria de Alvor foi possível obter o número de ovócitos mínimo para a sua análise. A produção de ovócitos na população do Rio Sado foi crescente ao longo do período de amostragem, atingido a produção média máxima no mês de junho

($1,495 \times 10^7$). O número médio de ovócitos por fêmea nas ostras com proveniência da Ria de Alvor foi de $7,234 \times 10^6$ (Figura 31).

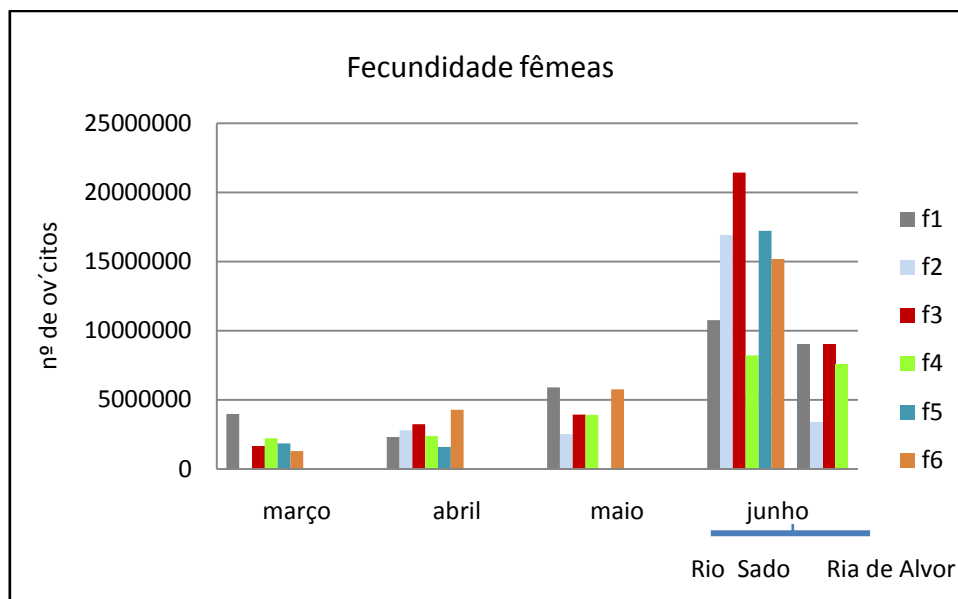


Figura 31: Variação média do número de ovócitos por fêmea durante o período de amostragem, das populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

Estatisticamente não se verificou diferenças entre as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor no mês de junho (ANOVA $p=0,145$). Para as ostras do Rio Sado, observou-se a existência de diferenças dentro das amostragens (K.W., $H=49,77$ d.f.=3, $p<0,001$) (junho com todas as outras), entre fêmeas e em todas as amostragem se verificou diferenças significativas inclusive nas fêmeas da Ria de Alvor ($p<0,05$).

4.9. TAXA DE FECUNDAÇÃO

Pela análise da Figura 32, verifica-se um decréscimo no sucesso na fecundação dos ovócitos das fêmeas provenientes do Rio Sado até ao mês de março, passando de uma percentagem de $82,8 \pm 15,0$ % de ovócitos fertilizados em março, para apenas $42,6 \pm 26,6$ % no mês de maio. No mês de junho ocorreu um aumento para $73,9 \pm 19,1$ %. Nas ostras da ria de Alvor, a taxa de fecundação foi de $84,4 \pm 6,3$ %. Estatisticamente verificou-se a existência de diferenças significativas entre amostragens para a população do Sado (K.W., $H=24,088$ d.f.=3, $p<0,001$), nomeadamente entre os meses

consecutivos de março e abril e de maio e junho. Verificou-se diferenças significativas entre fêmeas em todos os meses da amostragem e em ambas as populações ($p < 0.05$), no entanto não foram encontradas diferenças significativas entre as duas populações no mês de junho (K.W., $H=2,195$ d.f.=1, $p=0.138$).

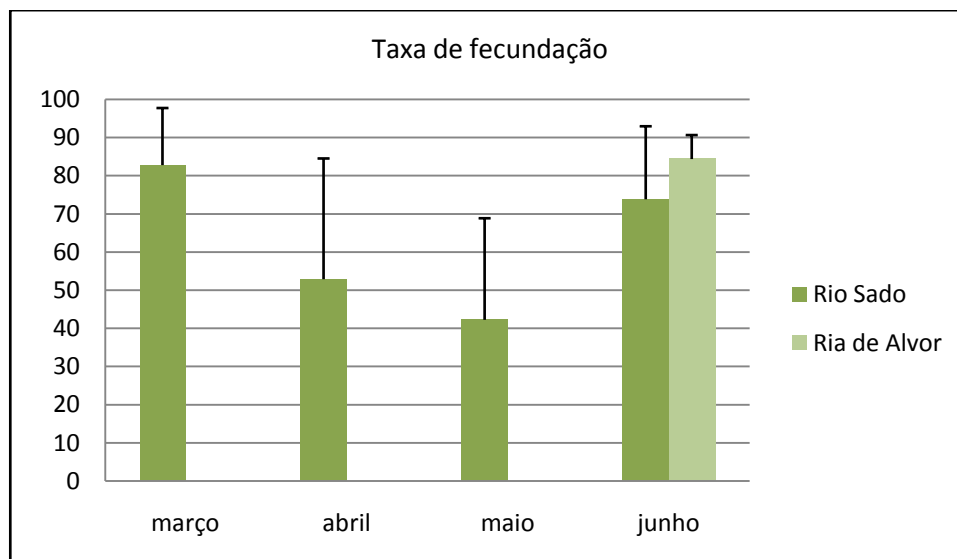


Figura 32: Variação média (\pm desvio padrão) da taxa de fecundação de *C. angulata*, ao longo do período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

4.10. TAXA DE ECLOSÃO

Pela análise dos resultados obtidos (Figura 33), verificou-se que a taxa de eclosão de larvas normais máxima ocorreu no mês de abril ($60,9 \pm 16,4$ %) e a mínima registou-se em junho ($39,2 \pm 21,2$) para a população do rio Sado. No entanto, verificou-se grandes variações desta taxa entre fêmeas, dentro do mesmo mês de amostragem.

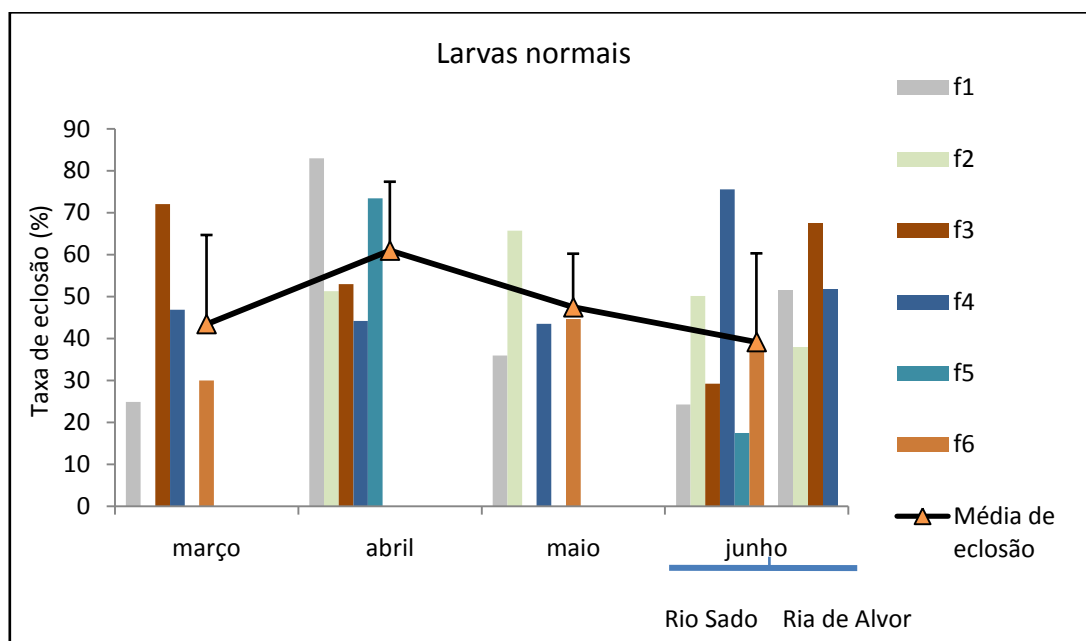


Figura 33: Variação da taxa de eclosão de larvas normais (larva D) de *C. angulata*, durante o período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria Alvor .

A fêmea com a taxa de eclosão de larvas normais mais elevada ocorreu no mês de abril (Fêmea 1 - 83 %) e a fêmea com a menor taxa de eclosão de larvas normais ocorreu em junho (fêmea 5 - 17,4 %).

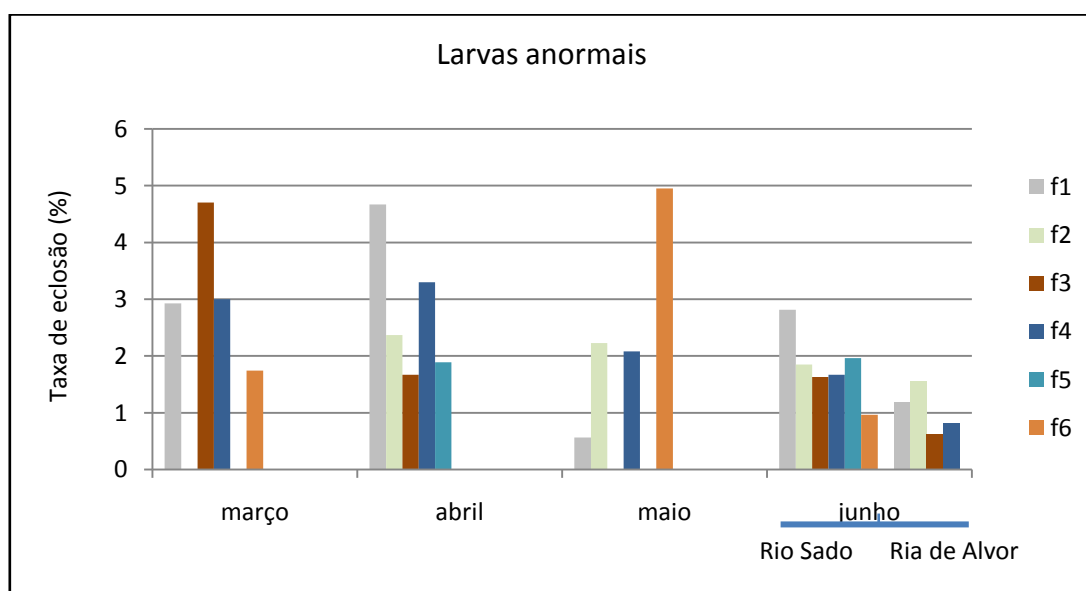


Figura 34: Variação da taxa de eclosão de larvas (Larva D) anormais de *C. angulata*, durante o período de amostragem para as populações do Rio Sado e da Ria de Alvor.

Na análise da taxa de eclosão de larvas anormais (Figura 34), verifica-se que a taxa mais elevada foi registada no mês de maio (fêmea 6 - 5%) e a mais baixa verificou-se igualmente no mês de maio (fêmea 1 - 0,6). Estatisticamente, verificou-se diferenças significativas entre amostragens na população do Sado para a taxa de eclosão das larvas normais (K.W., $H=28,40$ d.f.=3, $p<0,001$) e para a taxa de eclosão de larvas anormais (K.W., $H=17,933$ d.f.=3, $p<0,001$). Verificou-se a existência de diferenças significativas entre fêmeas por amostragem em todos os meses, quer para a taxa de eclosão de larvas normais quer para anormais ($p<0,05$), com exceção no mês de junho na taxa de eclosão de larvas anormais da população de Alvor (ANOVA $p=0,052$). Verificou-se também que existiram diferenças significativas entre as duas populações no mês de junho para a taxa de eclosão de larvas normais. A taxa de eclosão de larvas normais correlaciona-se positivamente com o índice gonadal das fêmeas ($p=0,0317$) e com o índice gonadal total da população (0,00194), nas ostras do Rio Sado. A taxa de eclosão de larvas normais mais elevada ocorreu no mês de abril ($60,9\pm16,4\%$), coincidindo com o maior índice gonadal total (3,933) e das fêmeas (4), registado na população do Rio Sado.

5. DISCUSSÃO

Nas espécies exotérmicas, o ciclo reprodutivo e a sua sincronização dentro de uma população são o resultado da sinergia entre os ritmos endógenos do organismo e os sinais exógenos do ambiente, nomeadamente a temperatura, a quantidade e qualidade do alimento, o fotoperíodo e a salinidade que podem afetar o crescimento e a reprodução dos bivalves (Lubet, 1980; Le Pennec, 2003).

A variação da temperatura da água no Rio Sado e na Ria de Alvor, durante o período de amostragem, obedece a um padrão sazonal e são caracterizados por baixas temperaturas durante os primeiros meses do ano, seguido de um progressivo aumento até ao último mês de amostragem. No entanto, a amplitude térmica dos dois locais estudados diferem, sendo esta superior, no Rio Sado, Chavez-Villalba *et al.*, (2002) demonstraram que o factor térmico amplifica o processo gametogénico. Mais ainda, outros autores defendem que não é uma determinada temperatura, mas sim o aumento da mesma que despoleta o início da gametogénese nos bivalves (Castro & Mattio, 1987). Efectivamente, no presente estudo, as ostras da população do Rio Sado tiveram uma evolução da gametogénese mais rápida, coincidente com uma amplitude maior do aumento da temperatura da água, comparativamente com as ostras da Ria de Alvor, onde a amplitude térmica é menor. No entanto, não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre o ciclo gametogénico das populações estudadas e a temperatura da água. Contudo, parece evidente que a temperatura não atua isoladamente no ciclo gametogénico de *C. angulata*.

A disponibilidade de alimento foi também um fator seguido durante este período sobre a forma de clorofila *a* e matéria orgânica na coluna de água, como sendo um possível interveniente na maturação sexual da espécie em estudo. A variação da clorofila *a* está, normalmente associada à variação de temperatura, ocorrendo um *bloom*, aquando o aumento da temperatura, na Primavera. A quantidade de clorofila *a* foi significativamente superior no Rio Sado em comparação com a da Ria de Alvor. No caso do Rio Sado, a relação entre o aumento dos níveis de clorofila *a* e o desenvolvimento da gametogénese é evidente, mas na Ria de Alvor esta não foi demonstrada estatisticamente. No entanto, os níveis de clorofila *a* na coluna

de água nem sempre são representativos da disponibilidade de alimento para as ostras. Uma vez que são espécies suspensívoras, a matéria orgânica em suspensão tem também um papel importante na alimentação e consecutivamente no desenvolvimento gametogénico da espécie (Quayle, 1988). Contudo, perante os resultados obtidos neste estudo, não foi possível traçar uma relação entre este parâmetro ambiental e o desenvolvimento sexual de *C. angulata*.

O índice de condição é muitas vezes reflexo da atividade reprodutiva dos bivalves (Massapina *et al.*, 1999; Ojea *et al.*, 2004). Entre o mês de março e maio, o índice de condição dos reprodutores provenientes do Rio Sado é ligeiramente superior aos dos reprodutores da Ria de Alvor. No mês de junho, verifica-se um decréscimo do índice de condição da população do Rio Sado, que coincide com o aumento da percentagem de indivíduos em fase de postura, com maior contribuição das fêmeas. O mesmo não acontece nos reprodutores da Ria de Alvor, onde este índice manteve-se sempre crescente. A correlação positiva encontrada entre o índice de condição dos reprodutores proveniente da Ria de Alvor e o índice gonadal das fêmeas evidencia que estes indivíduos ainda não estão no período de postura e que esta fase poderá desenvolver-se nos meses seguintes. A correlação negativa existente no índice de condição das ostras da Ria de Alvor e a matéria orgânica pode não ter valor biológico, pois o facto de não ter sido possível a amostragem no mês de maio, e os valores decrescerem consideravelmente no mês seguinte, o que poderá ter influenciado este resultado. A continuidade deste estudo poderá comprovar esta relação.

De um modo geral, o rácio sexual das duas populações estudadas aproxima-se de 1:1, à medida que se aproxima o período de postura dos gâmetas. Segundo alguns autores (Le Dantec, 1968; Vilela, 1974; Lango-Reynoso *et al.*, 1999), este rácio pode contribuir para o sucesso reprodutivo, uma vez que assim, a probabilidade de os gâmetas se encontrarem na coluna de água é maior.

O índice gonadal quantifica os estados de maturação e demonstra as diferenças entre as duas populações. De um ponto de vista geral, a actividade gametogénica de *C. angulata* apresenta um padrão sazonal nos dois locais estudados e está definido em 5 estados de maturação que coincidem com os propostos por Lango-Reynoso (2000) e Heude-Berthelin (2000) para a *C. gigas*.

Aquando o início da amostragem, as duas populações já tinha iniciado o processo gametogénico, apesar da existência de uma quantidade significativa de indivíduos de sexo indeterminado na população da Ria de Alvor. Nesta população, a gametogénese desenvolve-se crescentemente até ao mês de maio, onde se verifica o pico de maturação, sendo em junho que se inicia o período de postura. Apesar do desenvolvimento gametogénico ser mais rápido nos machos do que nas fêmeas e estes atingirem o pico de maturação no mês de maio, a população ficou sincronizada no início da época de postura (em junho). De facto, verificou-se que as fêmeas das duas populações necessitam de mais tempo para amadurecer que os machos, o que segundo Diaz (2009) poderá dever-se ao facto de as fêmeas serem metabolicamente mais ativas que os machos o que as leva a necessitarem de uma maior quantidade de nutrientes para amadurecerem sexualmente.

Nas ostras do Rio Sado a evolução da maturação sexual aconteceu mais rapidamente. Para além de que, em janeiro já não existem praticamente indivíduos indeterminados, o pico de maturação e desova aconteceu um mês antes do que ocorreu nas ostras provenientes da Ria de Alvor. O facto da postura ocorrer num período em que a a quantidade de clorofila *a* é elevada na coluna de água, evidencia a estratégia reprodutiva da espécie nos dois locais estudados, proporcionando desta forma, e uma maior disponibilidade de alimento às larvas.

Muitos estudos sugerem que a gametogénese dos bivalves está associada com o ciclo anual de acumulação e uso de energia, que é influenciado por parâmetros ambientais (Massapina *et al.*, 1999; Fabioux *et al.*, 2005). Geralmente, a energia é acumulada quando o alimento se torna abundante, e é utilizada na sintetização dos gâmetas, que são libertados durante o processo de reprodução. Este ciclo traduz-se num padrão sazonal da composição bioquímica que varia entre espécies e populações (Albentosa *et al.*, 2007). Contudo, neste estudo, apesar das diferenças entre os ciclos gametogénicos, a variação dos componentes bioquímicos estudados não apresentou diferenças significativas entre os reprodutores da população do Rio Sado e a população da Ria de Alvor. A quantidade de proteína ($14\text{--}27\ \mu\text{g.mg}^{-1}$ de peso seco), glicogénio ($3\text{--}12\ \mu\text{g.mg}^{-1}$ de peso seco) e lípidos totais ($3\text{--}8\ \mu\text{g.mg}^{-1}$ de peso seco) encontrada neste estudo para as duas populações estudadas, vão de encontro ao range de valores encontrados na bibliografia consultada (Joaquim, 1997; Massapina *et al.*, 1999; Ren *et*

al., 2003), para as ostras do género *Crassostrea*. Alguns autores sugerem que a proteína somática é utilizada como reserva de energia durante o processo gametogénico em bivalves (Liu *et al.*, 2008). Li *et al.*, (2009) refere uma correlação negativa entre o índice gonadal da população e as proteínas para a *C. gigas* em populações com restrições de alimento. Neste estudo verificou-se uma correlação positiva entre o conteúdo de proteínas e o índice gonadal dos machos para a população do Rio Sado, o que pode evidenciar uma estratégia diferente na utilização deste recurso energético e estrutural, devido, provavelmente a fatores ambientais. De facto, ao contrário da população estudada por Li *et al.*, (2009), a evolução do ciclo reprodutivo das populações do Rio Sado e da Ria de Alvor ocorre quando a disponibilidade de alimento no meio é maior. Esta estratégia pode permitir, que a espécie durante este período, para além de utilizar o alimento disponível para a reprodução, acumule energia sobre a forma estrutural.

O período onde ocorreu um decréscimo do conteúdo de glicogénio corresponde a um aumento do conteúdo lipídico em ambas as populações estudadas. Esta relação é demonstrada estatisticamente na correlação negativa encontrada entre estes parâmetros, na população do Rio Sado. Entre março e abril existe um aumento significativo do conteúdo de glicogénio que corresponde a um acumular de energia e que é posteriormente convertido em lípidos com intensificação da vitelogénese, assim o grande conteúdo lipídico existente antes da desova decresce imediatamente após esta, provavelmente como resultado da perda destes através dos gâmetas emitidos (Berthelin *et al.*, 2000). Os lípidos são, nos bivalves marinhos, a maior fonte metabólica de energia e refletem muitas vezes as condições ambientais em que estão inseridos. Geralmente são sintetizados a partir dos hidratos de carbono (lipogénese) e que podem estar acumulados na gónada durante a gametogénese ou serem transferidos de outros tecidos, nomeadamente do músculo adutor onde são acumulados em forma de glicogénio, ou podem ser obtidos diretamente da dieta (Pazos *et al.*, 1997). A relação inversa da concentração em lípidos totais relativamente ao conteúdo em glicogénio dos reprodutores de *C. angulata*, aquando a intensificação da formação dos gâmetas, evidencia a estratégia conservativa da espécie nas duas populações, no que diz respeito ao ciclo reprodutivo, ou seja, esta espécie utiliza as reservas acumuladas sob a forma de glicogénio, convertendo-a em lípidos para a formação dos gâmetas.

Observou-se também uma relação positiva entre o conteúdo de glicogénio e o conteúdo proteico nas ostras da Ria de Alvor, o que sugere que as proteínas não são usadas como fonte de energia para a manutenção, quando as reservas de hidratos de carbono se encontram depauperadas como referenciado por alguns autores para outras espécies de bivalves (Barber and Blake, 1981; Pérez-Camacho *et al.*, 2003; Joaquim *et al.*, 2008).

A qualidade dos ovócitos é um importante fator que determina a viabilidade larvar (Massapina *et al.*, 1999). Neste estudo, o estado de maturação gonadal das ostras do Rio Sado, permitiram obter ovócitos para análise a partir do mês de março. Contudo, apenas no mês de junho se conseguiu o número de ovócitos suficiente para analisar na população da Ria de Alvor. A quantidade relativa de proteínas (66-76%), lípidos totais (18-27%) e de hidratos de carbono (6-7%) encontrada nos ovócitos de *C. angulata* das duas populações estudadas aproxima-se bastante dos valores reportados em outros estudos realizados com outros bivalves (Massapina *et al.*, 1999; Holland D.L., 1978). Os quantitativos bioquímicos dos ovócitos obtidos na população da Ria de Alvor em junho, são significativamente diferentes dos quantitativos obtidos na população do Rio Sado, no mesmo mês. Estes equiparam-se mais aos encontrados nos ovócitos no início do período de desova (maio) desta população.

Massapina *et al.* (1999) verificou uma diminuição da qualidade bioquímica dos ovócitos ao longo do período de postura. Na população proveniente do Rio Sado, verificou-se que a qualidade bioquímica dos ovócitos, de um modo geral, variou significativamente entre amostragens, contudo não apresentou um decréscimo significativo, excepto na amostragem de junho. Pensa-se que, o facto de o período de amostragem não ter sido mais alargado, impediu a verificação do declínio da qualidade dos ovócitos e consequentemente das possíveis correlações com a qualidade dos progenitores, como foi reportado por Massapina *et al.* (1999), nomeadamente uma relação entre o índice de condição e os lípidos totais dos ovócitos. Por outro lado, também foi verificada a ocorrência de uma grande variabilidade entre fêmeas em todas as amostragens para ambas as populações, em todos os parâmetros bioquímicos estudados nos ovócitos. Poucos estudos evidenciam a importância do conteúdo proteico nos ovócitos mas a sua elevada quantidade poderá sugerir um papel importante durante o desenvolvimento larvar normal. Massapina *et al.*, 1999,

encontrou uma correlação positiva entre este parâmetro e o índice de condição dos progenitores, nesta mesma espécie. Contudo, neste estudo não foram encontradas relações entre as proteínas dos ovócitos e os parâmetros relativos à qualidade dos progenitores. Os lípidos totais nos ovócitos são o componente que mais contribui para a matéria orgânica a seguir às proteínas e são a principal fonte de energia para o desenvolvimento embrionário, enquanto as larvas não se alimentam exogenamente (Joaquim, 1997; Garcia-Gerrero *et al.*, 2003). Os lípidos neutros são componentes dos lípidos totais e têm como papel o fornecimento de energia na fase endotrófica das larvas e os fosfolípidos são componentes estruturais das membranas celulares (Garcia-Gerrero *et al.*, 2003). O valor máximo de lípidos totais nos ovócitos nas ostras do Rio Sado ocorreu em abril.

Os hidratos de carbono existem em reduzidas quantidades nos ovócitos o que sugere não terem uma importância significativa no fornecimento de energia nas primeiras fases larvares, mas parece ter um importante papel na embriogénese da síntese de compostos específicos (Holland, 1978; Garcia-Gerrero *et al.*, 2003).

A produção de ovócitos na população do Rio Sado foi crescente ao longo do período de amostragem, atingido a produção máxima no mês de junho. Contudo, o aumento da produção de ovócitos não significou um aumento da sua qualidade, no mês de junho, como já foi referido anteriormente. Efetivamente, o facto da taxa de fecundação ter aumentado neste mês, também não significou um aumento do sucesso da eclosão larvar. O método de obtenção dos ovócitos pode ter influenciado estes resultados, uma vez que a escarificação da gónada não permite selecionar apenas os ovócitos maduros e viáveis. Assim, na amostragem de junho, a população proveniente do Rio Sado já estava num estado avançado de postura e uma vez que esta espécie é emissora parcial (Massapina *et al.*, 1999), na gónada deveriam estar presentes ovócitos maduros, ovócitos em processo de reabsorção e ovócitos imaturos, que são também recolhidos para análise, afetando desta forma a avaliação da sua qualidade. Os valores da taxa de eclosão de veligeras normais (39-61%) encontram-se dentro dos valores obtidos por Joaquim (1997), para a mesma espécie. Apesar da variabilidade da taxa de eclosão entre fêmeas obtida em todos os meses de amostragem e em ambas as populações estudadas, verificou-se que este parâmetro correlaciona-se positivamente com o índice gonadal das fêmeas (e da população total), permitindo

traçar um índice de qualidade entre os progenitores a viabilidade larvar. A taxa de eclosão de larvas anormais não foi significativa ao longo do período de amostragem para ambas as populações estudadas.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O problema de compreender o desenvolvimento larvar e a sua sobrevivência é essencial para a expansão e desenvolvimento da aquacultura desta espécie. O estudo do estado fisiológico e da qualidade bioquímica dos progenitores torna-se determinante para o sucesso da produção em maternidade desta espécie.

De acordo com os objectivos propostos *i)* Descrição do ciclo gametogénico e avaliação da condição dos progenitores de *C. angulata* estabelecida em duas situações ambientais distintas (Rio Sado e Ria de Alvor). *ii)* Definição de índices de qualidade das posturas através da avaliação da composição bioquímica dos ovócitos durante o período natural de postura e da determinação das taxas de fecundação e de eclosão larvar poderemos retirar as seguintes ilações.

Aparentemente a estratégia reprodutiva desta espécie é flexível e extremamente dependente dos fatores ambientais, pois as diferenças existentes entre as duas populações que á partida têm a mesma origem e que são expostas a diferentes condições ambientais durante o ano, são demonstradas neste estudo. A quantidade de alimento e a temperatura parecem ter um papel decisivo na estratégia reprodutiva da espécie e estes fatores podem ser facilmente manipulados em maternidade, permitindo obter indivíduos maduros fora do período de reprodução natural. Este pode ser um factor importante na gestão de uma maternidade comercial.

Apesar do ciclo reprodutivo diferir nas duas populações, a estratégia de acumulação e utilização das reservas energéticas não apresentaram diferenças.

Podemos verificar que a qualidade bioquímica dos ovócitos não varia significativamente em diferentes condições ambientais, o que poderá ser um bom indicador para a produção desta espécie em maternidade.

Foi encontrado um índice de qualidade que permitiu ligar a qualidade dos progenitores à viabilidade larvar: o índice gonadal das fêmeas correlacionou-se positivamente com a taxa de eclosão larvar. Este índice permitirá ao produtor decidir se um lote de ostras poderá ser utilizado como reprodutores, perspectivando o sucesso larvar.

O método utilizado para a obtenção dos ovócitos, não permitiu encontrar índices de qualidade que englobem a qualidade dos progenitores, dos ovócitos e das larvas, uma vez que este não é seletivo em relação à maturação dos ovócitos. Assim, num próximo estudo sugere-se a utilização do método de choque térmico.

A *C. angulata* apresenta-se como uma alternativa viável na produção aquícola do nosso país, no entanto só a continuação do estudo e aplicação á aquacultura comercial poderá levar ao seu desenvolvimento, para isso é necessário uma sinergia do setor produtivo e do setor de investigação científica.

BIBLIOGRAFIA

- Albentosa M, Fernández-Reiriz M, Labarta U & Pérez-Camacho A. (2007). Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comp. Biochem. Phys.*, 146: 241-249.
- Almeida, M. J.; Machado, J.; Coimbra, J. (1997). Growth and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) at three fish farm earthen ponds. *Journal of shellfish research* 16: 455-462
- Bacca H. (2007). Etude des voies metaboliques des sucres chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les Mortalites estivales. Relatório de tese IFREMER/ Universte de Rennes. France, 218p.
- Barber B & Blake N. (1981). Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 52: 121-134.
- Batista F. (2007). Assessment of the aquacultural potential of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*, Instituto de Ciencias Biomédicas Abel Salazar. Porto. 220p.
- Bayne, B. L. (1976). Aspects of reproduction in bivalve molluscs. Academic Press, New York, 432-428.
- Berthelin C, Kellner K, & Mathieu M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West coast of France). *Comp. Biochem. Physiol.* 125: 359-369.

- Boudry P, Heurtebise S, Collet B, Cornette F & Gérard, A. (1998). Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) revealed by mtDNA RFLP analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 226: 279-291.
- Brooks W. (1891). *The Oyster*. The John Hopkins Press Ltd., London. 225p.
- Chávez-Villalba J, Cochard J-C, Le Pennec M, Barret J, Enríquez-Díaz M & Cáceres-Martínez C. (2003). Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22 (3): 721-731.
- Comps M. (1988). Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. In: Fisher, W. S. (ed.) *Disease processes in marine bivalve molluscs*. American Fisheries Society Special Publication Bethesda, MD, 8: 23-37.
- Coon S, Bonar D & Weiner M. (1986). Chemical production of cultchless oyster spat using epinephrine and nor-epinephrine. *Aquaculture* 58: 255-262.
- Diederich S, Nehls G, van Beusekom J, Reise K. (2005). Introduced Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the northern Wadden Sea: invasion accelerated by warm summers - *Helgol. Mar. Res.* 59: 97-106.
- Direção Geral das Pescas e Aquicultura (2010). *Recursos da Pesca, Série estatística, Volume 23 A-B ano de 2009*
- Eble A & Scro R. (1996) *General anatomy. The eastern oyster Crassostrea virginica*. Edited by Maryland sea Grant College, University of Maryland System, College Park.
- Enríquez-Díaz, Pouvreau S, Chávez-Villalba J & Le Pennec M. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster

Crassostrea gigas: evidence of an environment-dependent strategy M.,
aquaculture international Volume 17, Number 5: 491-506

Fabioux C, Huvet A, Lapègue S, Heurtebise S, Boudry P. (2002). Past and present geographical distribution of populations of Portuguese (Crassostrea angulata) and Pacific (C. gigas) oysters along the European and north African Atlantic coasts. Haliotis 31: 33-44.

Fabioux C, Huvet A, Le Souchu P, Le Pennec M & Pouvreau S. (2005). Temperature and photoperiod drive Crassostrea gigas reproductive internal clock. Aquaculture 250: 458-470.

FAO (2010) Food and Agriculture Organization Culture Aquatic Species Information European Production statistics (Crassostrea gigas) 2010. Acedido em junho de 2012- http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en

Castro-Fernandez N & Vido De Mattio N. (1987). Biochemical composition, condition index, and energy value of Ostrea puelchana (d'Orbigny): Relationships with reproductive cycle, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 108: 113–126.

Galtsoff P S. (1964). The American oyster Crassostrea virginica Gmelin. Fish. Bull. 64: 1-480.

Galtsoff P. (1964). The American oyster Crassostrea virginica Gmelin. Fish. Bull. 64: 1-480.

Garcia-Guerrero M, Racotta I & Villarreal H. (2003) Variation in Lipid, Protein and Carbohydrate content during the embryonic development of crayfish Cherax quadricarinatus. Journal of crustacean biology 23 (1): 1-6.

- Hawkins A, Bayne L, Bougrier S, Héral M, Iglesias J, Navarro E, Smith R & Urrutia M. (1998). Some general relationships in comparing the feeding physiology of suspension-feeding bivalve molluscs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 219: 87-103.
- Helm M, Bourne N & Lovatelli A. (2006). Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual practico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO. 184p.
- Héral M & Deslous-Paoli J. (1991). Oyster culture in European countries. In: Menzel, W. (ed.), *Estuarine and marine bivalve mollusk culture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 153-190.
- Hess H, Lees J & Derr J. (1978). A linear-Lowroy-Folim assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate solubilized proteins *Analytical Biochemistry* 85: 259-300.
- Holland D & Spencer B. (1973) Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth, *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 53: 287–298.
- Holland D. (1978) Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates, in: Malins D.C., Sargent J.R. (Eds.), *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*, Vol. 4, Academic Press, New York, 85–123.
- Joaquim S, Matias D & Moreno O. (2008) . Cultivo de bivalves em maternidade, instituto de investigación y formacion agraria y pesquera. Andaluzia. 84p.
- Lango-Reynoso F, Chavez-Villaiba J, Cochard J & Le Pennec M, (1999). Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *Aquaculture* 190: 183–199.

- Le Dantec J. (1968). Ecologie et reproduction de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata* (Lamark), dans le Bassin d'Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 32 (3): 237-362.
- Li Q, Osada M, & Mori K., (2000). Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadial tissue during sexual maturation. Fish Sci 66 : 502-508
- Li Y, Qin JG, Li X, & Benkendorff K. (2009). Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). Aquaculture, 286: 64-71.
- Lowroy O, Rosenbrough N, Farr A & Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275
- Maroco J. (2007). Análise Estatística – Com utilização do SPSS. Edições Sílabo, Lisboa 822p.
- Massapina C, Joaquim S, Matias D & Devauchelle N. (1999). Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve, South Portugal. Aquat. Living Resour. 12: 327–333
- Pazos AJ, Roman G, Acosta CP, Sanchez JL & Abad M. (1997) Comp Biochem Physiol 117B:393.
- Pérez-Camacho A, Delgado M, Fernández-Reiriz M & Labarta U. (2003). Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 258: 133-145.
- Quayle D. (1988). Pacific oyster culture in British Columbia. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 218: 241.

- Ren J S, Marsden I D & Ross A H. (2003). Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand [J]. *N Z J Mar Freshw Res*, 37: 171-182.
- Robert R, Gérard A. (1999). Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquat. Living Resour.* 12 (2): 121-130.
- Ruano F. (1997). Fisheries and farming of important bivalves in Portugal. In: U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS. 129: 191-200.
- Ojea J, Pazos A, Martinez D, Novoa S, Sanchez J & Abad M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*. 238: 451-468.
- Sargent JR (1995) Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Bromage NR, Roberts RJ (eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, Oxford, 353p.
- Steele S & Mulcahy M. (1999). Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Asso. UK* 79: 673-686.
- Vilela H. (1975). A respeito de Ostras. *Biologia - exploração – salubridade*. *Crassostrea angulata* (Lamarck) em especial. Parte II *Biologia (A Ostra Portuguesa)*. Ed. Orbis Ilustrações Lda. 101p.
- Walne, P. (1974). *Culture of Bivalve Molluscs: Fifty years Experience at Conwy*. Whitefriars Press, London. 173p.
- WoRMS *Crassostrea angulata* (Lamarck 1819) World Register of Marine Species
Acedido em Julho de 2012, disponível em:
<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=146900>